



t(15;17) oligomix Alert kit
Búsqueda del ADNc PML-RARA bcr1, bcr2 y bcr3

REF

BANG12-02

El procedimiento prevé la realización de tres grupos de reacciones de amplificación:

- dos reacciones de amplificación sucesivas (nested) específicas para la translocación PML-RARA variante bcr1 y variante bcr2;
- dos reacciones de amplificación sucesivas (nested) específicas para la translocación PML-RARA variante bcr3;
- una reacción de amplificación simple para la transcripción del gen RARA, utilizado como control de idoneidad de la muestra.

Las reacciones de amplificación se realizan a partir del producto de reacción de transcripción inversa obtenido del ARN extraído de las muestras en examen. La presencia de los productos específicos de la segunda reacción de amplificación indica la presencia del ADNc de la translocación PML-RARA en el producto de la reacción de transcripción inversa. La presencia del producto específico de la amplificación de control indica la existencia del ADNc del gen RARA en el producto de la reacción de transcripción inversa y por lo tanto, la idoneidad de la muestra en examen.

t(15;17) oligomix Alert kit
búsqueda del ADNc PML-RARA bcr1, bcr2 y bcr3

REF BANG12-02



INDICE

USO PREVISTO	pág. 1
PRESENTACIÓN DEL KIT	pág. 1
CARACTERÍSTICAS DEL KIT	pág. 2
OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS	pág. 2
MATERIAL PROVISTO EN EL KIT	pág. 3
MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL KIT	pág. 3
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	pág. 3
MUESTRAS Y CONTROLES	pág. 5
PROCEDIMIENTO	pág. 5
BIBLIOGRAFÍA	pág. 9
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	pág. 10
SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS	pág. 12

USO PREVISTO

El kit «t(15;17) oligomix Alert kit» se utiliza en la búsqueda del ADNc de la translocación PML-RARA, t(15;17) variantes bcr1, bcr2 y bcr3 en el producto de la reacción de transcripción inversa obtenido del ARN total extraído de muestras de sangre periférica recolectada en EDTA, sangre medular recolectada en EDTA y suspensiones leucocitarias.

La búsqueda del ADNc de la translocación PML-RARA con una prueba de amplificación puede utilizarse para la comprobación diagnóstica o el monitoreo en el tiempo de la presencia de dicho reordenamiento descubierto en la totalidad de los casos de leucemia promielocítica aguda (LAP).

PRESENTACIÓN DEL KIT

El kit provee las mezclas de reacción **OligoMIX bcr1** para las primeras y para las segundas amplificaciones PML-RARA variante bcr1 y variante bcr2, las mezclas de reacción **OligoMIX bcr3** para las primeras y las segundas amplificaciones PML-RARA variante bcr3 y las mezclas de reacción **OligoMIX RARA** para la amplificación de control RARA, **previamente dosificadas en probetas «monotest» listas para su uso.**

CARACTERÍSTICAS DEL KIT

La **sensibilidad de la reacción** permite detectar la presencia de aproximadamente **10 moléculas de ADN blanco (equivalentes a aproximadamente diez ADNc de la translocación PML-RARA)** en los 5 µL de producto de la reacción de transcripción inversa agregados a la probeta «monotest».

Nota: si se extraen 10x10⁶ leucocitos con el kit «EXTRAzol» (ver apartado siguiente referido a los kits de accesorios) y se realiza la reacción de transcripción inversa con el kit «RT - Kit plus» (ver apartado siguiente referido a los kits de accesorios) la sensibilidad del método es equivalente a aproximadamente 250 ADNc / 1x10⁶ leucocitos.

El kit permite efectuar **25 reacciones**, controles positivos y negativos incluidos.

OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS

Los reactivos para la extracción del ARN de las muestras a analizar, para la transcripción inversa del ARN, para los controles positivos de amplificación y la detección del ADN amplificado, **no** están incluidos en este kit. Para realizar estas fases analíticas se aconseja la utilización de los siguientes kits accesorios producidos por ELITechGroup S.p.A.:

- «EXTRAzol» (código EXTR01), kit de extracción del ARN de muestras celulares;
- «RT - Kit plus» (código BRK200), kit de transcripción inversa del ARN con "random primer";
- «t(15;17) - Positive Control» (código CTRG12), control positivo de amplificación de ADN plasmídico;
- «DNA polymerase 2U / µL» (código ER140 y ER40), enzima ADN polimerasa termoestable para la amplificación de los ácidos nucleicos; el kit permite efectuar 125 reacciones;
- «ELECTROPHORESIS 3» (código EPH03), revelación del ADN amplificado para electroforesis en gel de agar.

MATERIAL PROVISTO EN EL KIT

BANG12-02 / 05 CONFECCIÓN 1

Componente	Descripción	Cantidad	Composición	Etiquetado
OligoMIX bcr1 de primera amplificación	mezcla de amplificación en probetas AZULES de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleótidos externos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-
OligoMIX bcr3 de primera amplificación	mezcla de amplificación en probetas NEUTRAS de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleótidos externos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-
OligoMIX RARA amplificación de CONTROL	mezcla de amplificación en probetas AMARILLAS de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleótidos internos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-
OligoMIX bcr1 de segunda amplificación	mezcla de amplificación en probetas ROJAS de 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleótidos externos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-
OligoMIX bcr3 de segunda amplificación	mezcla de amplificación en probetas VERDES de 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleótidos externos, Cloruro de potasio, TRIS base, TRIS clorhidrato, Triton X-100, Cloruro de magnesio, Desoxinucleótidos trifosfatos, aceite de vaselina	-

MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL KIT

- Campana de flujo laminar
- Guantes descartables de látex o similares
- Microcentrifuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas y tips estériles con filtro para aerosol o de desplazamiento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL).
- Agua bidestilada estéril.
- Termostato programable (thermal - cycler).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este kit es para uso exclusivo *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si pudiesen transmitir agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No producir salpicaduras ni aerosol. El material que está en contacto con las muestras biológicas debe ser tratado con hipoclorito de sodio al 3% por al menos 30 minutos o bien, tratado en autoclave a 121°C durante una hora antes de ser eliminado.

Manipular y eliminar todos los reactivos y todos los materiales usados para realizar la prueba como si fuesen agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. No producir salpicaduras ni aerosol. Los residuos deben ser tratados y eliminados según normas de seguridad adecuadas. El material combustible monouso debe ser incinerado. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben ser neutralizados antes de la eliminación.

- Usar indumentaria de protección y guantes adecuados, protegerse los ojos o la cara.
- No pipetear con la boca ninguna solución.
- No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en el área de trabajo.
- Lavarse bien las manos después del manejo de muestras y reactivos.
- Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos según las normas vigentes.
- Leer todas las instrucciones provistas en el kit antes de realizar la prueba.
- Respetar las instrucciones provistas en el kit durante la ejecución de la prueba.
- Respetar la fecha de caducidad del kit.
- Utilizar sólo los reactivos presentes en el kit y los aconsejados por el fabricante.
- No intercambiar reactivos que provengan de lotes diferentes.
- No utilizar reactivos que provengan de kits de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones en los procedimientos de biología molecular

Los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la transcripción inversa, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos, requieren personal instruido para evitar el riesgo de resultados incorrectos, en particular a causa de la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o de la contaminación de las mismas por parte de productos de amplificación.

Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación o para la amplificación / detección de los productos de amplificación. Nunca introducir un producto de amplificación en el área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos destinados para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de productos de amplificación. Nunca transferir batas, guantes e instrumentos del área de amplificación / detección de productos de amplificación al área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Las muestras deben ser destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben ser manipuladas bajo una campana de flujo laminar. Las probetas que contengan muestras diferentes nunca deben ser abiertas al mismo tiempo. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o usar tips con filtro para aerosol. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los reactivos deben ser manipulados bajo campana de flujo laminar. Los reactivos necesarios para la amplificación deben ser preparados de manera tal que sean utilizados en una sola sesión. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o usar tips con filtro para aerosoles. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los productos de amplificación deben ser manipulados en modo de limitar al máximo su dispersión en el ambiente para evitar contaminaciones. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de amplificación deben ser destinadas sólo a este uso.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes.

Las probetas que contienen las **OligoMIX** para la **primera amplificación**, para la **segunda amplificación** y para la **amplificación de control** son desechables y por lo tanto deben utilizarse sólo una vez en reacciones de amplificación.

Con las **OligoMIX** para la **primera amplificación**, para la **segunda amplificación** y para la **amplificación de control** se deben tener en cuenta los siguientes consejos de prudencia (S):

- S 23-25.** No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evitar el contacto con los ojos.

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

El material a utilizar con este kit debe estar constituido por el producto de la reacción de transcripción inversa (ADNc) obtenido del ARN extraído de muestras biológicas.

El sistema de transcripción inversa del ARN debe utilizar los "random primer" para producir la reacción de polimerización.

Cuando se utilizan muestras biológicas celulares, por ejemplo sangre entera, se aconseja verificar la cantidad de ARN total extraído que se agrega a la reacción de transcripción inversa, para evitar la aparición de productos inespecíficos y posibles fenómenos de inhibición en la siguiente reacción de amplificación.

La concentración final máxima del ARN total en la reacción de transcripción inversa debería ser aproximadamente 40 ng / µL. Por ejemplo, la cantidad máxima de ARN total a agregar en la reacción de transcripción inversa con un volumen final de 25 µL es de aproximadamente 1 µg.

El sistema de extracción del ARN de la muestra de partida debe proveer ARN adecuado al uso en reacciones de transcripción inversa y amplificación.

Se aconseja preparar varias dosificaciones de las muestras para conservarlas congeladas para evitar someterlas a repetidos ciclos de congelación/ descongelación.

Controles de amplificación

Es absolutamente necesario confirmar cada una de las sesiones de amplificación preparando una reacción de control negativo y una reacción de control positivo.

Para el control negativo utilizar agua bidestilada estéril (no provista en el kit) agregándola a la reacción en lugar del ADNc obtenido de la muestra.

Para el control positivo utilizar el ADNc obtenido de una muestra positiva ya testada o bien el «t(15;17) - Positive Control».

Controles de calidad

Se aconseja confirmar todo el procedimiento de análisis de cada una de las sesiones, extracción y amplificación, utilizando una muestra negativa y una muestra positiva ya testadas o del material de referencia calibrado.

PROCEDIMIENTO

Programación del ciclo térmico

Antes de iniciar la sesión es necesario:

- controlar que el bloqueo térmico del termostato programable (thermal - cycler, T.C.) sea compatible con el formato de las **probetas «monotest»** provistos en el kit (probetas de 0,2 mL);
- controlar en el manual de instrucciones del equipo la modalidad de regulación de la temperatura que el thermal - cycler adopta para la ejecución del ciclo térmico;
- cuando sea posible, seleccionar la modalidad de **regulación de la temperatura directamente en el bloque térmico** (por ejemplo thermal - cycler Hybaid™ o Eppendorf™): no usar la modalidad de regulación de la temperatura mediante probeta-sonda con software de simulación;
- cuando no sea posible y para los thermal - cycler GeneAmp PCR System **9600, 2400, 9700 o 2700** (Applied Biosystems™) usar la modalidad de regulación de la temperatura predefinida;
- programar en el thermal - cycler los parámetros del ciclo térmico descriptos en la tabla siguiente.

Ciclo térmico de la primera amplificación

Número de ciclos	Temperaturas	Tiempos
1 ciclo	95° C	4 min.
35 ciclos	95° C	1 min.
	65° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 ciclo	72° C	5 min.

Ciclo térmico de la segunda amplificación

Número de ciclos	Temperaturas	Tiempos
1 ciclo	95° C	2 min.
30 ciclos	95° C	1 min.
	65° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 ciclo	72° C	5 min.

Preparación de la primera amplificación

Antes de iniciar la sesión es necesario:

- descongelar las muestras a analizar y el control positivo, centrifugarlos durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlos en hielo;
- descongelar una **probeta «monotest» azul (bcr1)** por cada una de las muestras a analizar, una para el control negativo y una para el control positivo, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.
- descongelar una **probeta «monotest» neutra (bcr3)** por cada una de las muestras a analizar, una para el control negativo y una para el control positivo, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.
- descongelar una **probeta «monotest» amarilla (Control RARA)** por cada una de las muestras a analizar, una para el control negativo, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.
- diluir la enzima «DNA pol. 2U / µL» con agua bidestilada estéril (no provista en el kit) como se describe en la tabla siguiente. Preparar un volumen de enzima diluida suficiente para todas las reacciones previstas (controles incluidos) más una, para contar con un margen de seguridad. La enzima diluida **no** puede conservarse.

Número de reacciones	«DNA pol. 2U / µL»	Agua	Volumen 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. Agregar a cada una de las **probetas «monotest» azules, neutras y amarillas 5 µL** de ADN polimerasa termoestable diluida (1 U).
2. Agregar a cada una de las **probetas «monotest» azules, neutras y amarillas 5 µL** de ADNc. Proceder de igual manera con el control negativo y con los controles positivos.
3. Transferir las **probetas «monotest» azules, neutras y amarillas** en el thermal - cycler y comenzar el ciclo térmico de la primera amplificación.

Preparación de la segunda amplificación

Antes de iniciar la sesión es necesario:

- descongelar tantas **probetas «monotest» rojas (bcr1)** como sean las azules, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener el contenido en el fondo; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.
- descongelar tantas **probetas «monotest» verdes (bcr3)** como sean las neutras, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener el contenido en el fondo; marcarlas de manera reconocible con un rotulador indeleble y mantenerlas en hielo.
- diluir la enzima «DNA pol. 2U / µL» con agua bidestilada estéril (no provista en el kit) en una concentración final de **0,2 U/µL** como fue descrito anteriormente.

4. Agregar a cada una de las **probetas «monotest» rojas y verdes 5 µL** de ADN polimerasa termoestable diluida (1 U).
5. Agregar a cada una de las **probetas «monotest» rojas (bcr1) 1 µL** de producto de la primera amplificación de la correspondiente **probeta «monotest» azul (bcr1)**.
6. Agregar a cada una de las **probetas «monotest» verdes (bcr3) 1 µL** de producto de la primera amplificación de la correspondiente **probeta «monotest» neutra (bcr3)**.

Nota: El producto de la primera amplificación tiene la capacidad de contaminar las pruebas siguientes. Aislar el producto residual de la primera amplificación y cambiar los guantes al final de esta fase del procedimiento.

7. Transferir las **probetas «monotest» rojas y verdes** en el thermal - cycler y comenzar el ciclo térmico de la segunda amplificación.

Nota: El producto de reacción puede conservarse a -20°C por un período máximo de un mes.

Revelación del producto específico de amplificación.

El producto específico de la segunda amplificación puede ser detectado e identificado mediante separación electroforética en las condiciones descritas a continuación:

- utilizando un gel de agar al 2% con bromuro de etidio 1 µg / mL en tampón TBE 1x (89 mM TRIS, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA disódico);
- utilizando un gel de agar al 4% con bromuro de etidio 1 µg / mL en tampón TAE 1x (40 mM TRIS, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA disódico), como en los productos de la serie «ELECTROPHORESIS».

Los **productos específicos de la segunda amplificación bcr1** tienen dimensiones de: **214 bp (PML-RARA bcr1) de 50 a 200 bp (PML-RARA bcr2)**

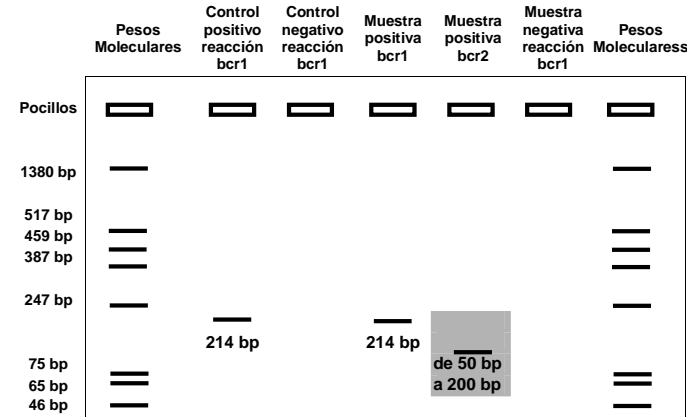
Los **productos específicos de la segunda amplificación bcr3** tienen dimensiones de: **289 bp (PML-RARA bcr3)**

El **producto específico de la amplificación Control RARA** tiene dimensiones de: **175 bp (RARA)**

Nota: El producto de amplificación específico del ADNc de la translocación PML-RARA variante bcr2 puede tener dimensiones diferentes en las distintas muestras positivas como consecuencia de la variabilidad del punto de rotura en el exon 6 del gen PML.

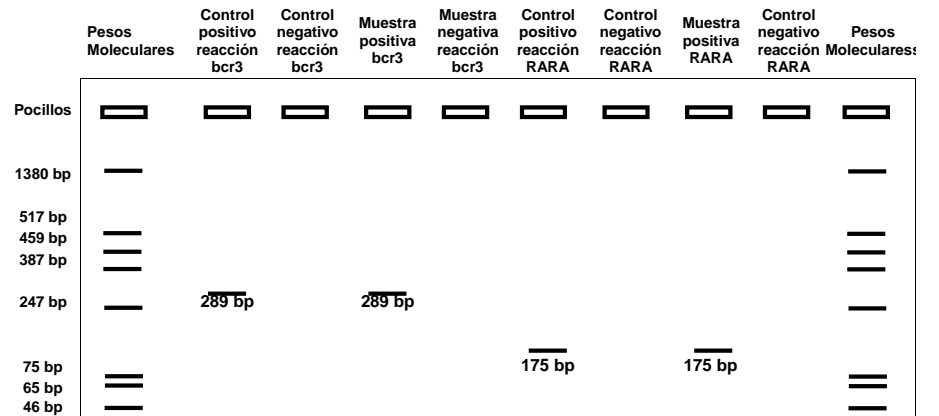
Nota: El producto de la segunda amplificación tiene la capacidad de contaminar las pruebas siguientes. Aislar el producto residuo de la segunda amplificación y los desechos producidos en la fase de detección.

A título de ejemplo, se muestra a continuación un esquema que representa el resultado de la separación electroforética de una sesión de amplificación para la variante bcr1 y bcr2 en la que fueron analizadas muestras que presentan los distintos perfiles electroforéticos.



Nota: El producto de amplificación específico del ADNc de la translocación PML-RARA variante bcr2 puede tener una migración en gel diferente en las distintas muestras positivas como consecuencia de la variabilidad del punto de rotura en el exon 6 del gen PML.

A título de ejemplo, se muestra a continuación un esquema que representa el resultado de la separación electroforética de una sesión de amplificación para la variante bcr3 y para el Control RARA en la que fueron analizadas muestras que presentan los distintos perfiles electroforéticos.



Es absolutamente necesario confirmar la identidad del producto de la segunda amplificación de una muestra comparando su migración en gel con la migración de un marker de peso molecular y con la migración del producto de la segunda amplificación del control positivo.

La eventual presencia de productos inespecíficos de dimensiones diferentes de las de los productos específicos de la segunda amplificación de una muestra no tiene significado alguno respecto de la búsqueda del ADNc de la translocación PML-RARA variantes bcr1, bcr2 y bcr3 y del ADNc del gen RARA.

Convalidación general de la sesión de amplificación

Los resultados de las reacciones de control negativo y de control positivo son utilizados para convalidar la sesión de amplificación como se describe en las tablas siguientes:

Amplificación del control negativo	Amplificación
Producto específico AUSENTE	correcta

Amplificación del control positivo	Amplificación
Producto específico PRESENTE	correcta

Si el producto específico de amplificación está presente en la reacción de control negativo, se han verificado problemas en la fase de amplificación (contaminación) que pueden causar resultados falsos positivos, la prueba debe repetirse a partir de la fase de amplificación.

Si el producto específico de amplificación está ausente en la reacción de control positivo, se han verificado problemas en la fase de amplificación (amplificación no eficiente o ausente) que pueden causar resultados falsos negativos, la prueba debe ser repetida a partir de la fase de amplificación.

Interpretación de los resultados

Los resultados de las reacciones referidas a las muestras que se analizan se utilizan para evaluar la presencia del ADNc de la translocación PML-RARA, como se describe en las tablas siguientes:

Amplificación de la muestra	Resultado de la prueba	ADNc PML-RARA
Producto específico AUSENTE	negativo	AUSENTE
Producto específico PRESENTE	positivo	PRESENTE

Antes de confirmar definitivamente el resultado "ADNc PML-RARA AUSENTE" para una muestra en análisis, se debe analizar el resultado obtenido con la amplificación de control para el ADNc del gen RARA en la reacción correspondiente a esta muestra.

El resultado obtenido para el ADNc del gen RARA se utiliza para realizar el control de idoneidad de la muestra (control externo de calidad), como se describe en la tabla siguiente:

Amplificación de la muestra	Resultado de la prueba	ADNc RARA	Muestra
Producto específico AUSENTE	negativo	PRESENTE	APTA
Producto específico PRESENTE	positivo	AUSENTE	NO APTA

Si el resultado de la amplificación Control RARA es **negativo**, el ADNc del gen RARA está **AUSENTE** y la muestra es **NO APTA**, se han verificado problemas en la fase de amplificación (amplificación no eficiente o ausente), en la fase de transcripción inversa (transcripción inversa no eficiente o ausente) o en la fase de extracción (ausencia de ARN o presencia de inhibidores). La muestra es un **falso negativo** y la prueba debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

BIBLIOGRAFÍA

J.J.M. van Dongen y at. (1999) *Leukemia* 211/99 b 13 (1): 1901 - 1928

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Producto específico de amplificación presente en la reacción de control negativo

Causas posibles	Soluciones
Error durante la dispensación del ADNc	Abrir una probeta a la vez, evitar esparcir el contenido de la probeta, cambiar siempre de tip.
Error durante la dispensación del producto de primera amplificación	Abrir una probeta a la vez, evitar esparcir el contenido de la probeta, cambiar siempre de tip.
Contaminación de los reactivos preparados para la sesión.	Seguir atentamente la dilución y la dispensación de la enzima, cambiar siempre de tip
Contaminación del agua estéril para la dilución de la enzima	Utilizar una nueva alícuota de agua estéril
Contaminación de stock de enzima	Utilizar una nueva alícuota de la enzima
Contaminación del área de extracción/preparación de las reacciones de amplificación.	Limpiar superficies e instrumentos con detergentes acuosos, lavar batas, sustituir probetas y tips en uso.

Producto específico de amplificación ausente en la reacción de Positive Control

Causas posibles	Soluciones
Enzima demasiado diluida o error durante la dispensación de la enzima	Volver a controlar los cálculos de dilución, seguir atentamente la dispensación de la enzima y mezclar de manera adecuada
Error durante la dispensación del control positivo	Seguir atentamente la dispensación del control positivo
Degradación del control positivo	Utilizar una nueva alícuota de control positivo
Error de programación del ciclo térmico	Controlar el ciclo térmico programado en el thermal - cycler.
Error durante la dispensación del producto de primera amplificación	Extraer y distribuir prestando atención el producto de la primera amplificación en la segunda amplificación
Error durante la siembra del producto de la segunda amplificación en el gel	Prestando atención al sembrar el producto de la segunda amplificación en el gel

Productos inespecíficos de amplificación presentes en las reacciones de las muestras

Causas posibles	Soluciones
Enzima demasiado concentrada	Volver a controlar los cálculos de dilución de la enzima
Tiempos de preparación de la primera reacción de amplificación demasiado largos	Mantener en hielo las probetas a las cuales ya se les ha agregado el ADNc hasta que sean transferidas al thermal-cycler
Error de programación del ciclo térmico	Controlar el ciclo térmico programado en el thermal cycler.
Exceso de ADNc en la reacción	Evaluar la concentración del ARN presente en la reacción de transcripción inversa, no superar una concentración de 40 ng / µL (1 µg de ARN en una reacción de 25 µL finales).

Producto específico de amplificación ausente en la reacción de Control ABL de las muestras

Causas posibles	Soluciones
Presencia de heparina en la muestra de sangre entera	Se debe utilizar EDTA o citrato como anticoagulante para la muestra de sangre.
Error en la conservación de la muestra de sangre	La sangre debe ser tratada, para la extracción del ARN, pocas horas después de su recolección y nunca debe congelarse.
Error en la fase de extracción	Controlar las operaciones de extracción. Preparar y realizar la extracción siguiendo con atención las instrucciones.
Degradación de la muestra extraída	La extracción del ARN debe ser realizada con material y reactivos sin la presencia de ARNsa. El ARN extraído debe ser conservado a -20°C o a -80°C.
Error en la fase de transcripción inversa	Controlar las operaciones de transcripción inversa. Preparar y realizar la reacción de transcripción inversa siguiendo con atención las instrucciones.
Error en la fase de amplificación	Ver las sugerencias del apartado "Producto específico de amplificación ausente en la reacción de control positivo"

SIGNIFICADO DE LOS SIMBOLOS



Número de catálogo.



Límite superior de temperatura.



Código de lote.



Utilizar antes del último día del mes.



Dispositivo médico diagnóstico *in vitro*.



Conforme a los requisitos de la Directiva Europea 98/79/CE correspondiente a los dispositivos médicos diagnósticos *in vitro*.



Contenido suficiente para "N" test.



Contenido.



Atención, consultar las instrucciones de uso.



Fabricante.

La adquisición de este producto permite al comprador utilizarlo para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos con el fin de proveer servicios de diagnóstico humano *in vitro*. Este derecho es otorgado sólo si el producto provisto es utilizado junto a un producto con licencia para el "Positive Control" y para la detección, de ELITechGroup S.p.A. Por medio de la adquisición no se otorga ningún derecho general u otra licencia de tipo diferente de este derecho específico de uso.