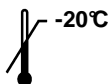




## t(15;17) oligomix Alert kit

recherche de l'ADNc PML-RARA bcr1, bcr2 et bcr3

REF BANG12-02



### TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	Page 1
DESCRIPTION	Page 1
CARACTÉRISTIQUES DU KIT	Page 2
AUTRES PRODUITS REQUIS	Page 2
MATÉRIEL FOURNI	Page 3
MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI	Page 3
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	Page 3
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 5
PROCÉDURE	Page 5
BIBLIOGRAPHIE	Page 9
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	Page 10
LÉGENDE DES SYMBOLES	Page 12

### APPLICATION

Ce kit est utilisé pour la recherche de l'ADNc du transcrit PML-RARA, t(15;17) variantes bcr1, bcr2 et bcr3 dans le produit de la réaction de transcription inverse obtenu à partir de l'ARN total extrait d'échantillons de sang périphérique prélevé sur EDTA, sang médullaire prélevé sur EDTA et suspensions leucocytaires.

La recherche de l'ADNc de la translocation PML-RARA avec un test d'amplification peut être utilisée aux fins de la vérification diagnostique ou du monitoring dans le temps de la présence de ce transcrit détecté dans la quasi-totalité des cas de leucémie aiguë promyélocytaire (LAP).

### DESCRIPTION

Le kit fournit le mélange de réaction **OligoMIX bcr1** pour les premières et les secondes amplifications PML-RARA variante bcr1 et variante bcr2, les mélanges de réaction **OligoMIX bcr3** pour les premières et les secondes amplifications PML-RARA variante bcr3 et les mélanges de réaction **OligoMIX RARA** pour l'amplification RARA de contrôle, déjà **pré-aliquotés en tubes «monotest» prêts à l'emploi**.

## t(15;17) oligomix Alert kit

recherche de l'ADNc PML-RARA bcr1, bcr2 et bcr3

REF

BANG12-02

La procédure prévoit l'exécution de trois groupes de réactions d'amplification :

- deux réactions successives d'amplification (nested) spécifiques pour la translocation PML-RARA variante bcr1 et variante bcr2 ;
- deux réactions successives d'amplification (nested) spécifiques pour la translocation PML-RARA variante bcr 3;
- une réaction d'amplification individuelle pour le transcrit du gène RARA, utilisé comme contrôle de conformité de l'échantillon.

Les réactions d'amplification sont effectuées à partir du produit de la réaction de transcription inverse obtenue de l'ARN extrait des échantillons à l'examen. La présence des produits spécifiques de la seconde réaction d'amplification indique la présence de l'ADNc de la translocation PML-RARA dans le produit de la réaction de transcription inverse. La présence du produit spécifique de l'amplification de contrôle indique la présence de l'ADNc du gène RARA dans le produit de la réaction de transcription inverse donc la conformité de l'échantillon.

### CARACTÉRISTIQUES DU KIT

La sensibilité de la réaction permet de révéler la présence d'environ **10 molécules d'ADN cible (soit environ dix ADNc de la translocation PML-RARA)** dans les 5µL de produit de la réaction de transcription inverse ajoutés au tube «monotest».

**Remarque:** si l'on extrait 10x10<sup>6</sup> leucocytes avec le kit «EXTRAzol» (voir paragraphe suivant sur les kits accessoires) et que l'on effectue la réaction de transcription inverse avec le kit «RT - Kit plus» (voir paragraphe suivant sur les kits accessoires) la sensibilité de la méthode est égale à environ 250 ADNc / 1x10<sup>6</sup> leucocytes.

Le kit permet d'effectuer **25 réactions**, contrôles positifs et négatifs inclus.

### AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ARN des échantillons à analyser pour la transcription inverse de l'ARN et pour le contrôle positif d'amplification et pour la révélation de l'ADN amplifié **ne sont pas** compris dans ce kit. Pour procéder à ces phases d'analyse, il est conseillé d'utiliser les kits accessoires suivants fabriqués par ELITechGroup S.p.A.:

«EXTRAzol» (code EXTR01), kit d'extraction de l'ARN à partir d'échantillons cellulaires.

«RT-Kit plus» (code BRK200), kit de transcription inverse de l'ARN avec "random primer".

«t(15;17) - Positive Control» (code CTRG12), contrôle positif d'amplification d'ADN plasmidique.

«DNA polymerase 2U / µL» (code ER40 et ER140), enzyme ADN polymérase thermostable pour l'amplification des acides nucléiques, qui permet d'effectuer 125 réactions.

«ELECTROPHORESIS 3» (code EPH03), kit de révélation de l'ADN amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose.

**MATÉRIEL FOURNI**

Composant	Description	Quantité	Composition	Étiquetage
OligoMIX bcr1 de première amplification	mélange d'amplification en tubes BLEUS de 0,2 mL.	25 x 90 µL	Oligonucléotides externes, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-
OligoMIX bcr3 de première amplification	mélange d'amplification en tubes NEUTRES de 0,2 mL.	25 x 90 µL	Oligonucléotides externes, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-
OligoMIX RARA amplification de CONTRÔLE	mélange d'amplification en tubes JAUNES de 0,2 mL.	25 x 90 µL	Oligonucléotides internes, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-
OligoMIX bcr1 de seconde amplification	mélange d'amplification en tubes ROUGES de 0,2 mL.	25 x 94 µL	Oligonucléotides externes, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-
OligoMIX bcr3 de seconde amplification	mélange d'amplification en tubes VERTS de 0,2 mL.	25 x 94 µL	Oligonucléotides externes, chlorure de potassium, TRIS base, TRIS chlorhydrate, Triton X-100, Chlorure de magnésium, Désoxynucléotides triphosphates, huile de vaseline.	-

**MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI**

- Hotte à flux laminaire.
- Gants jetables en latex ou équivalent.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12.000 - 14.000 Tr/min).
- Micro pipettes et embouts stériles avec filtre pour aérosol ou à distribution positive (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL).
- Eau bi-distillée stérile.
- Thermostat programmable (thermocycleur).

**AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS**

**Ce kit est réservé uniquement à l'usage *in vitro*.**

**Avertissements et précautions**

Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Éviter le contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Le matériel qui entre en contact avec les échantillons biologiques doit être décontaminé à l'hypochlorite de sodium à 3% pendant un temps minimum de 30 minutes ou autoclavé à 121°C pendant une heure avant d'être éliminé.

Manipuler et éliminer tous les réactifs et tous les matériels utilisés pour le test comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Éviter le contact direct avec les réactifs. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Les déchets doivent être traités et éliminés conformément aux normes de sécurité. Le matériel jetable combustible doit être incinéré.

Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant leur élimination.

Porter des vêtements de protection et des gants et protéger les yeux ou le visage.

Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.

Ne pas manger, boire, fumer ni se maquiller dans l'environnement de travail.

Se laver parfaitement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.

Éliminer les réactifs en surplus et les déchets en respectant les réglementations en vigueur.

Lire toutes les instructions fournies dans le kit avant de procéder au test.

Respecter scrupuleusement les consignes fournies dans le kit pendant l'exécution du test.

Respecter la date de péremption du kit.

N'utiliser que les réactifs présents dans le kit et ceux conseillés par le producteur.

Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

Ne pas utiliser de réactifs provenant de kits d'autres fabricants.

**Avertissements et précautions à adopter en biologie moléculaire**

Les procédures de biologie moléculaire, comme l'extraction, la transcription inverse, l'amplification et la révélation d'acides nucléiques doivent être exécutées par un personnel ayant reçu une formation appropriée afin d'éviter tout risque de résultats erronés dus en particulier à la dénaturation des acides nucléiques ou à la contamination des échantillons par des produits d'amplification.

Il est nécessaire de disposer de zones distinctes pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / révélation des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification.

Il est nécessaire de disposer de blouses, gants et instruments dédiés pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / révélation des produits d'amplification. Ne jamais transférer les blouses, gants et instruments de la zone dédiée à l'amplification / révélation des produits d'amplification vers la zone dédiée à l'extraction / préparation des réactions d'amplification.

Les échantillons ne doivent être utilisés que pour ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les tubes contenant des échantillons différents ne doivent jamais être ouverts simultanément. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être du type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase et RNase, dépourvus d'ADN et ARN.

Les réactifs doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés de façon à être utilisés en une seule étape de travail. Les pipettes utilisées pour manipuler les réactifs ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être de type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase et RNase, dépourvus d'ADN et ARN.

Les produits d'amplification doivent être manipulés de façon à en limiter le plus possible la dispersion dans l'environnement afin d'éviter tout risque de contamination. Les pipettes utilisées pour manipuler les produits d'amplification ne doivent servir qu'à cet usage exclusif.

**Avertissements et précautions concernant les composants**

Les tubes contenant les OligoMix pour la première et la seconde amplification et pour l'amplification de contrôle sont jetables et ils ne doivent donc être utilisés qu'une seule fois pour des réactions d'amplification.

L'utilisation des OligoMIX pour la première et pour la seconde amplification et pour l'amplification de contrôle implique les conseils de prudence suivants (S):

**S 23-25.** Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols. Éviter le contact avec les yeux.

**ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES**

**Échantillons**

Le matériel à utiliser avec ce kit doit être constitué du produit de la réaction de transcription inverse (ADNc) obtenu à partir de l'ARN extrait d'échantillons biologiques.

Le système de transcription inverse de l'ARN doit utiliser les "random primer" pour l'amorçage de la réaction de polymérisation.

Lors de l'utilisation d'échantillons biologiques cellulaires, par exemple sang total, il est conseillé de vérifier la quantité d'ARN total extrait incorporé à la réaction de transcription inverse afin d'éviter l'apparition de produits non spécifiques et d'éventuels phénomènes d'inhibition lors de la réaction d'amplification suivante.

La concentration finale maximale d'ARN total dans la réaction de transcription inverse devrait être d'environ 40 ng / µL. Par exemple, la quantité maximale d'ARN total qu'il est possible d'incorporer à une réaction de transcription inverse avec volume final de 25 µL est d'environ 1 µg.

Le système d'extraction de l'ARN de l'échantillon initial doit fournir un ARN approprié à l'utilisation en réactions de transcription inverse et d'amplification.

Il est conseillé de préparer plusieurs aliquotes des échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à des cycles de congélation / décongélation répétés.

**Contrôles d'amplification**

Chaque étape d'amplification doit impérativement être validée en préparant une réaction de contrôle négatif et une réaction de contrôle positif.

Pour le contrôle négatif, utiliser de l'eau bi-distillée stérile (non comprise dans le kit) à ajouter à la réaction à la place de l'ADNc extrait de l'échantillon.

Pour le contrôle positif, utiliser l'ADNc obtenu à partir d'un échantillon positif déjà testé ou le «t(15;17) - Positive Control».

**Contrôles de la qualité**

Il est conseillé de valider toute la procédure d'analyse de chaque session, extraction et amplification, en utilisant un échantillon négatif et un échantillon positif déjà testés ou du matériel de référence calibré.

**PROCÉDURE**

**Paramétrage du cycle de température**

Avant de lancer l'étape, il est nécessaire de :

- Vérifier que le bloc thermique du thermostat programmable (thermocycleur, T.C.) soit compatible avec le format des tubes «monotest» fournis dans le kit (tubes de 0,2 mL).
- Vérifier sur la documentation de l'instrument, le système de contrôle de température adopté par le thermocycleur pour l'exécution des cycles de température.
- Lorsque cela est possible, sélectionner le système de **contrôle de température directement sur le bloc thermique** (par exemple thermal cycler HybaidTM ou EppendorfTM) : ne pas utiliser le système de contrôle de température à l'aide d'éprouvette-sonde ou de logiciel de simulation.
- Lorsque cela n'est pas possible, pour les thermocycleurs GeneAmp PCR System **9600, 2400, 9700** ou **2700** (Applied Biosystems™), utiliser le système de contrôle de température prédéfini.
- Paramétrer le thermocycleur avec les paramètres indiqués dans le tableau suivant.

**Cycle de température de la première amplification**

Nombre de cycles	Températures	Temps
1 cycle	95° C	4 min.
35 cycles	95° C	1 min.
	65° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 cycle	72° C	5 min.

**Cycle de température de la seconde amplification**

Nombre de cycles	Températures	Temps
1 cycle	95° C	2 min.
30 cycles	95° C	1 min.
	65° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 cycle	72° C	5 min.

**Préparation de la première amplification**

Avant de lancer l'étape, il est nécessaire de :

- Décongeler les échantillons à analyser et le contrôle positif, «t(15;17) - Positive Control», les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond et les conserver dans la glace.
- Décongeler un tube «monotest» bleu (bcr1) pour chacun des échantillons à analyser, un pour le contrôle négatif et un pour le contrôle positif, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable avec un feutre indélébile et les conserver dans la glace.
- Décongeler un tube «monotest» neutre (bcr3) pour chacun des échantillons à analyser, un pour le contrôle négatif et un pour le contrôle positif, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable avec un feutre indélébile et les conserver dans la glace.
- Décongeler un tube «monotest» jaune (Contrôle RARA) pour chacun des échantillons à analyser et un pour le contrôle négatif, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable avec un feutre indélébile et les conserver dans la glace.
- En suivant les indications du tableau ci-dessous, diluer l'enzyme «DNA pol. 2U / µL» avec de l'eau bi-distillée stérile (non comprise dans le kit). Préparer un volume d'enzymes diluées suffisant pour toutes les réactions prévues (contrôles compris) plus un, afin de disposer d'une marge de sécurité. L'enzyme diluée ne peut être conservée.

Nombre de réactions	«DNA pol. 2U / µL»	Eau	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. Ajouter à chaque tube «monotest» bleu (bcr1), neutre (bcr3) et jaune (RARA) 5 µL d'ADN polymérase thermostable diluée (1 U).
2. Ajouter à chaque tube «monotest» bleu, neutre et jaune 5 µL de l'ADNc obtenu. Procéder de la même façon avec le contrôle négatif et les contrôles positifs.

3. Transférer les tubes «*monotest*» bleu, neutre et jaune dans le thermocycleur et lancer le cycle thermique de la première amplification.

**Préparation de la seconde amplification**

Avant de lancer l'étape, il est nécessaire de :

- Décongeler autant de tubes «*monotest*» rouges (bcr1) que de tubes bleus, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable à l'aide d'un feutre indélébile et les conserver dans la glace.
- Décongeler autant de tubes «*monotest*» verts (bcr3) que de tubes neutres, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu sur le fond ; les marquer de façon reconnaissable à l'aide d'un feutre indélébile et les conserver dans la glace.

- En suivant les indications fournies précédemment, diluer l'enzyme «DNA pol. 2U / µL» (non comprise dans le kit) avec de l'eau bi-distillée stérile (non comprise dans le kit).

- Ajouter à chaque tube «*monotest*» rouge (bcr1) et vert (bcr3) 5 µL d'ADN polymérase thermostable dilué (1 U).
- Ajouter à chaque tube «*monotest*» rouge (bcr1) 1 µL de produit de la première amplification du tube «*monotest*» bleu (bcr1) correspondant.
- Ajouter à chaque tube «*monotest*» vert (bcr3), 1 µL de produit de la première amplification du tube «*monotest*» neutre (bcr3) correspondant.

**Remarque :** Le produit de la première amplification peut contaminer les tests suivants. Confiner le produit résiduel de la première amplification et changer de gants au terme de cette phase de la procédure.

7. Transférer les tubes «*monotest*» rouges et verts dans le thermocycleur et lancer le cycle thermique de la seconde amplification.

**Remarque :** Le produit de réaction peut être conservé à - 20° C pendant un temps maximum d'un mois.

**Révélation du produit d'amplification spécifique**

Le produit spécifique de la seconde amplification peut être révélé et identifié par séparation électrophorétique dans les conditions suivantes :

- en utilisant un gel d'agarose à 4% avec bromure d'éthidium 1 µg / mL en tampon TAE 1x (20 mM TRIS base, 20 mM acide borique, 1 mM EDTA disodique) comme dans les produits de la série "ELECTROPHORESIS 3".

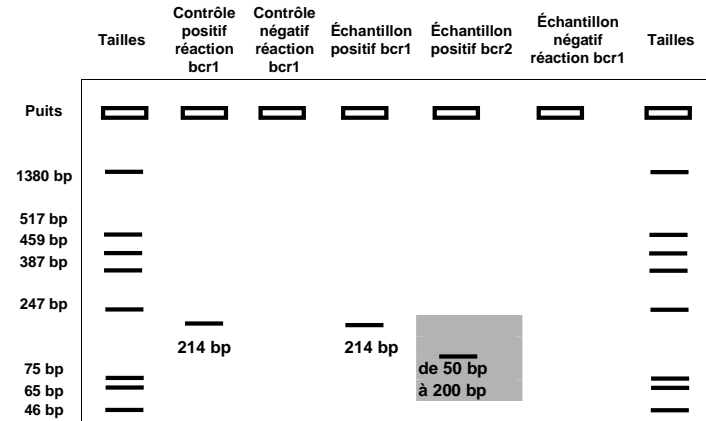
Les produits spécifiques de la seconde amplification bcr1 ont des tailles de : **214 bp (PML-RARA bcr1)**  
**de 50 à 200 bp (PML-RARA bcr2)**

Les produits spécifiques de la seconde amplification bcr3 ont des tailles de : **289 bp (PML-RARA bcr3)**

Le produit spécifique de l'amplification Contrôle RARA a une taille de : **175 bp (RARA)**

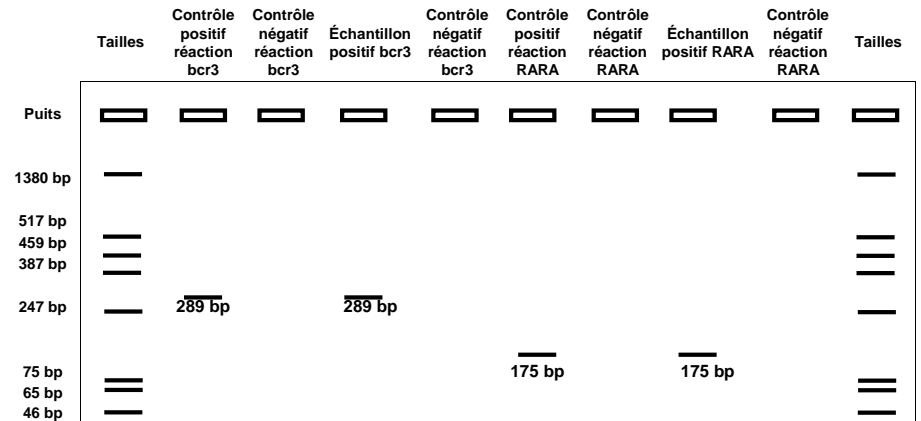
**Remarque :** Le produit de la seconde amplification peut contaminer les tests suivants. Confiner le produit résiduel de la seconde amplification et les déchets produits au cours de la phase de révélation.

À titre d'exemple, la figure ci-dessous schématise le résultat de la séparation électrophorétique d'une étape d'amplification pour la variante bcr1 et bcr2 au cours de laquelle ont été analysés les échantillons qui présentent les différents profils électrophorétiques.



**Remarque :** Le produit spécifique d'amplification de l'ADNc de la translocation PML-RARA variante bcr2 peut avoir des tailles différentes dans les différents échantillons positifs à cause de la variabilité du point de rupture du gène PML.

À titre d'exemple, la figure ci-dessous schématise le résultat de la séparation électrophorétique d'une étape d'amplification pour la variante bcr3 et pour le Contrôle RARA au cours de laquelle ont été analysés les échantillons qui présentent les différents profils électrophorétiques.



Il est impératif de valider l'identité du produit de la seconde amplification d'un échantillon en comparant sa migration sur gel à celle d'un marqueur de poids moléculaire et à celle du produit de la seconde amplification du contrôle positif.

La présence éventuelle de produits non spécifiques de tailles différentes de celles des produits spécifiques de la seconde amplification d'un échantillon n'a aucune signification aux fins de la recherche de l'ADNc de la translocation PML-RARA, variantes bcr1 et bcr3 et de l'ADNc du gène RARA.

#### Validation générale de l'étape d'amplification

Les résultats des réactions de contrôle négatif et de contrôle positif sont utilisés pour valider l'étape d'amplification comme décrit dans les tableaux suivants:

Amplification du contrôle négatif	Amplification
Produit spécifique ABSENT	correcte

Amplification du contrôle positif	Amplification
Produit spécifique PRÉSENT	correcte

Si le produit d'amplification spécifique est présent dans la réaction de contrôle négatif, cela indique la survenue de problèmes en phase d'amplification (contamination) pouvant engendrer de faux résultats positifs, le test doit être répété à partir de la phase d'amplification.

Si le produit spécifique d'amplification est absent de la réaction de contrôle positif, cela indique la survenue de problèmes en phase d'amplification (amplification inefficace ou absente) pouvant engendrer de résultats faux négatifs, le test doit être répété à partir de la phase d'amplification.

#### Interprétation des résultats

Les résultats des réactions relatives aux échantillons analysés sont utilisés pour évaluer la présence de l'ADNc de la translocation PML-RARA comme décrit dans le tableau suivant :

Amplification de l'échantillon	Résultat du test	ADNc PML-RARA
Produit spécifique ABSENT	négatif	ABSENT
Produit spécifique PRÉSENT	positif	PRÉSENT

Avant de valider définitivement le résultat "ADNc PML-RARA ABSENT" d'un échantillon, il est nécessaire d'analyser le résultat obtenu avec l'amplification de contrôle pour l'ADNc du gène RARA dans la réaction d'amplification relative à cet échantillon.

Le résultat obtenu pour l'ADNc du gène RARA est utilisé pour effectuer le contrôle de conformité de l'échantillon (contrôle qualité externe) comme décrit dans le tableau suivant :

Amplification de l'échantillon	Résultat du test	ADNc RARA	Échantillon
Produit spécifique ABSENT	négatif	PRÉSENT	CONFORME
Produit spécifique PRÉSENT	positif	ABSENT	NON CONFORME

Si le résultat de l'amplification Contrôle RARA est **négatif**, l'ADNc du gène RARA est **ABSENT** et l'échantillon est **NON CONFORME**, cela indique la survenue de problèmes en phase d'amplification (amplification inefficace ou absente), en phase de transcription inverse (transcription inverse inefficace ou absente) ou en phase d'extraction (absence d'ARN ou présence d'inhibiteurs). L'échantillon est un **faux négatif** et le test doit être répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

#### BIBLIOGRAPHIE

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

#### PROBLÈMES ET SOLUTIONS

##### Produit spécifique d'amplification présent dans la réaction de contrôle négatif

Causes éventuelles	Solutions
Erreur pendant la distribution de l'ADNc	Ouvrir un tube à la fois, éviter d'en répandre le contenu, changer chaque fois d'embout.
Erreur pendant la distribution du produit de première amplification	Ouvrir un tube à la fois, éviter d'en répandre le contenu, changer chaque fois d'embout.
Contamination des réactifs préparés pour l'étape	Suivre attentivement la dilution et la distribution de l'enzyme, changer chaque fois d'embout
Contamination de l'eau stérile pour la dilution de l'enzyme	Utiliser un nouvel aliquot d'eau stérile
Contamination du stock d'enzymes	Utiliser un nouvel aliquot d'enzymes
Contamination de la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification	Nettoyer les surfaces et les instruments à l'aide d'un détergent aqueux, laver les blouses et remplacer les tubes et les embouts utilisés

##### Produit spécifique d'amplification absent dans la réaction du Positive Control

Causes éventuelles	Solutions
Enzyme trop diluée ou erreur pendant la distribution de l'enzyme	Contrôler les calculs de dilution, suivre attentivement la distribution de l'enzyme et mélanger correctement
Erreur pendant la distribution du contrôle positif	Suivre attentivement la distribution du contrôle positif
Dénaturalisation du contrôle positif	Utiliser un nouvel aliquot de contrôle positif
Erreur de paramétrage du cycle de température	Vérifier le cycle de température paramétré sur le thermocycleur.
Erreur pendant la distribution du produit de première amplification	Prélever et distribuer soigneusement le produit de première amplification dans la seconde amplification
Erreur pendant la distribution du produit de seconde amplification dans le gel	Charger soigneusement le produit de la seconde amplification dans le gel










##### Produits non spécifiques d'amplification présents dans les réactions des échantillons

Causes éventuelles	Solutions
Enzyme trop concentrée	Vérifier les calculs de dilution de l'enzyme
Temps de préparation de la première réaction d'amplification trop longs	Conserver dans la glace les tubes auxquels a déjà été ajouté l'ADNc, jusqu'à leur transfert dans le thermocycleur.
Erreur de paramétrage du cycle de température	Vérifier le cycle de température paramétré sur le thermocycleur.
Excès d'ADNc dans la réaction	Évaluer la concentration de l'ARN dans la réaction de transcription inverse ; ne pas dépasser une concentration de 40 ng / µg (1 µg d'ARN dans une réaction de 25 µL finaux).

Produit spécifique d'amplification absent dans la réaction de contrôle ABL des échantillons

Causes éventuelles	Solutions
Présence d'héparine dans l'échantillon de sang total.	L'échantillon de sang doit utiliser comme anticoagulant EDTA ou sodium citrate.
Erreur de conservation de l'échantillon de sang	Pour l'extraction de l'ARN, le sang doit être traité dans les heures suivant immédiatement le prélèvement et il ne doit jamais être congelé.
Erreur en phase d'extraction	Contrôler les opérations d'extraction. Préparer et effectuer l'extraction en suivant scrupuleusement les consignes fournies.
Dégradation de l'échantillon extrait	L'extraction de l'ARN doit être effectuée à partir de matériel et de réactifs dépourvus de RNase. L'ARN extrait doit être conservé à -20°C ou à -80°C.
Erreur en phase de transcription inverse	Contrôler les opérations de transcription inverse. Préparer et effectuer la transcription inverse réaction en suivant scrupuleusement les consignes fournies.
Erreur en phase d'amplification	Consulter les suggestions fournies au paragraphe "Produit spécifique d'amplification absent de la réaction de contrôle positif".

**LÉGENDE DES SYMBOLES**

-  Référence du catalogue.
-  Seuil supérieur de température.
-  Numéro du lot.
-  Date de péremption (dernier jour du mois).
-  *In vitro* diagnostic.
-  Conforme aux exigences essentielles de la Directive européenne 98/79/CE concernant le diagnostic *in vitro*
-  Contenu suffisant pour "N" tests.
-  Attention, consulter le mode d'emploi.
-  Fabriqué par