



t(15;17) oligomix Alert kit
pesquisa do cDNA PML-RARA bcr1, bcr2 e bcr3

REF BANG12-02

t(15;17) oligomix Alert kit
pesquisa do cDNA PML-RARA bcr1, bcr2 e bcr3

REF BANG12-02



ÍNDICE

USO PREVISTO
APRESENTAÇÃO DO KIT
CARACTERÍSTICAS DO KIT
OUTROS PRODUTOS REQUERIDO
MATERIAL INCLUÍDO NO KIT
MATERIAL NECESSÁRIO NÃO INCLUÍDO NO KIT
ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES
AMOSTRAS E CONTROLOS
PROCEDIMENTO
BIBLIOGRAFIA
PROBLEMAS E SOLUÇÕES
SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS

pág. 1
pág. 1
pág. 2
pág. 2
pág. 3
pág. 3
pág. 3
pág. 6
pág. 6
pág. 9
pág. 10
pág. 12

USO PREVISTO

O kit «t(15;17) oligomix Alert kit» é utilizado na **pesquisa do cDNA da translocação PML-RARA, t(15;17) variantes bcr1, bcr2 e bcr3** no produto da reacção de transcrição reversa obtido a partir do RNA total extraído de amostras de sangue periférico colectado em EDTA, sangue medular colectado em EDTA e suspensões de leucócitos.

A pesquisa do cDNA da translocação PML-RARA com um teste de amplificação pode ser utilizada para a confirmação do diagnóstico ou o monitoramento no tempo da presença de tal rearranjo encontrado em quase todos os casos de leucemia promielocítica aguda (LAP).

APRESENTAÇÃO DO KIT

O kit fornece as misturas de reacção **OligoMIX bcr1** para as primeiras e segundas amplificações PML-RARA variante bcr1 e variante bcr2, as misturas de reacção **OligoMIX bcr3** para as primeiras e segundas amplificações PML-RARA variante bcr3 e as misturas de reacção **OligoMIX RARA** para a amplificação RARA de controlo, já **pré-aliquotadas em tubos «monoteste» prontos para o uso.**

CARACTERÍSTICAS DO KIT

A **sensibilidade da reacção** permite detectar a presença de aproximadamente **10 moléculas de DNA branco (iguais a aproximadamente dez cDNA da translocação PML-RARA)** nos 5 µL de produto da reacção de transcrição reversa adicionados ao tubo «monoteste».

Nota: se são extraídos 10x10⁶ de leucócitos com o kit «**EXTRAzol**» (veja parágrafo seguinte sobre produtos acessórios) e se realiza a reacção de transcrição reversa com o kit «**RT - Kit plus**» (veja parágrafo seguinte sobre produtos acessórios), a sensibilidade do método é igual a aproximadamente 250 cDNA / 1x10⁶ de leucócitos.

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

OUTROS PRODUTOS REQUERIDO

Os reagentes para a extracção do RNA das amostras a analisar, para a transcrição reversa do RNA para o controlos positivos 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.:

«**EXTRAzol**» (código EXTR01), kit de extracção do RNA das amostras celulares;

«**RT - Kit plus**» (código BRK200), kit de transcrição reversa do RNA com "random primer";

«**t(15;17) - Positive Control**» (código CTRG12), controlo positivo de amplificação de DNA plasmídico;

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

«**ELECTROPHORESIS 3**» (código EPH03), detecção do DNA amplificado por electroforese em gel de agarose.

MATERIAL INCLUÍDO NO KIT

Componente	Descrição	Quantidade	Composição	Etiquetagem
OligoMIX bcr1 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	-
OligoMIX bcr3 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	-
OligoMIX RARA amplificação de CONTROLO	mistura de amplificação em tubos AMARELOS de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotídeos internos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton x-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina	-
OligoMIX bcr1 de segunda amplificação	mistura de amplificação em tubos VERMELHOS de 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleotídeos externos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton x-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina	-
OligoMIX bcr3 de segunda amplificação	mistura de amplificação em tubos VERDES de 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleotídeos externos, 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 descartáveis em látex ou similares.
- Microcentrifuga 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).
- Água bidestilada estéril.
- Termóstato programável (thermal - cycler).

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 sobrantes 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

O material para utilizar com este kit deve ser constituído pelo produto da reacção de transcrição reversa (cDNA) obtido do RNA extraído das amostras biológicas.

O sistema de transcrição reversa do RNA deve utilizar o "random primer" para os primers da reacção de polimerização.

Quando se empregam amostras biológicas celulares, por exemplo sangue inteiro, aconselha-se verificar a quantidade de RNA total extraído que é introduzida na reacção de transcrição reversa, para evitar o aparecimento de produtos específicos e possíveis fenómenos de inibição na seguinte reacção de amplificação.

A concentração final máxima do RNA total na reacção de transcrição reversa deveria ser de aproximadamente 40 ng / µL. Por exemplo, a quantidade máxima de RNA total que pode ser introduzida em uma reacção de transcrição reversa com volume final de 25 µL é de aproximadamente 1 µg.

O sistema de extracção do RNA da amostra de partida deve fornecer RNA idóneo ao uso em reacções de transcrição reversa e amplificação.

Aconselha-se preparar mais alíquotas das amostras para conservar congeladas de modo a não submetê-las a ciclos de congelamento / descongelamento repetidos.

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 cDNA extraído da amostra.

Para o controlo positivo, utilizar o cDNA obtido de uma amostra positiva já testada ou o «t(15;17) - 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

Antes de iniciar a sessão é necessário:

- verificar que o bloqueio térmico do termóstato programável (thermal - cycler, T.C.) seja compatível com o formato dos tubos «monoteste» incluídos no kit (tubos de 0,2 mL);
- verificar na documentação do equipamento 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™): não utilizar a modalidade de controlo da temperatura por meio de tubo-sonda ou com software de simulação;
- quando não for possível e para os thermal - cycler GeneAmp PCR System 9600, 2400, 9700 ou 2700 (Applied Biosystems™), utilizar a modalidade de controlo da temperatura pré-definida;
- programar no thermal - cycler os parâmetros do ciclo térmico descritos na tabela seguinte.

Ciclo térmico da primeira amplificação

Número de ciclos	Temperaturas	Tempos
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 da segunda amplificação

Número de ciclos	Temperaturas	Tempos
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.

Preparação da primeira amplificação

Antes de iniciar a sessão é necessário:

- descongelar as amostras a serem analisadas e o controlo positivo, centrifugá-los por 5 segundos para levar ao fundo o conteúdo e mantê-los em gelo.
- descongelar um tubo «monoteste» azul (bcr1) 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 (bcr3) 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 (Controlo RARA) para cada uma 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.
- diluir como descrito na tabela a seguir a enzima «DNA pol. 2U / µL» com água bidestilada estéril (não fornecida no kit). Preparar um volume de enzima suficientemente diluído para todas as reacções previstas (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, neutro e amarelo 5 µL de DNA polimerase termoestável diluída (1 U).
2. Acrescentar a cada tubo «monoteste» azul, neutro e amarelo 5 µL de cDNA. Proceder do mesmo modo com o controlo negativo e com os controlos positivos.
3. Transferir os tubos «monoteste» azuis, neutros e amarelos no thermal - cycler e iniciar o ciclo térmico da primeira amplificação.

Preparação da segunda amplificação

Antes de iniciar a sessão é necessário:

- descongelar tanto os **tubos «monoteste» vermelhos (bcr1)** 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 (bcr3)** 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.
- diluir a enzima «DNA pol. 2U / µL» com água bidestilada estéril (não fornecida no kit) até a concentração final de **0,2 U/µL**, como descrito anteriormente.

4. Acrescentar a cada **tubo «monoteste» vermelho e verde 5 µL** de DNA polimerase termoestável diluída (1 U).
5. Acrescentar a cada **tubo «monoteste» vermelho (bcr1) 1 µL** de produto da primeira amplificação do correspondente **tubo «monoteste» azul (bcr1)**.
6. Acrescentar a cada **tubo «monoteste» verde (bcr3) 1 µL** de produto da primeira amplificação do correspondente **tubo «monoteste» neutro (bcr3)**.

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 thermal - cycler e iniciar o ciclo térmico da segunda amplificação.

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

Detecção do produto específico de amplificação

O produto específico da segunda amplificação pode ser detectado e identificado por meio da separação electroforética dentro das condições descritas a seguir:

- utilizando um gel de agarose ao 2% de brometo de etídio 1 µg / mL em tampão TBE 1x (89 mM TRIS, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA dissódico);
- utilizando um gel de agarose ao 4% com brometo de etídio 1 µg / mL em tampão TAE 1x (40 mM TRIS, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA dissódico), como nos produtos da série «ELECTROPHORESIS».

Os produtos específicos da segunda amplificação bcr1 tem dimensões de: **214 bp (PML-RARA bcr1)**
de 50 a 200 bp (PML-RARA bcr2)

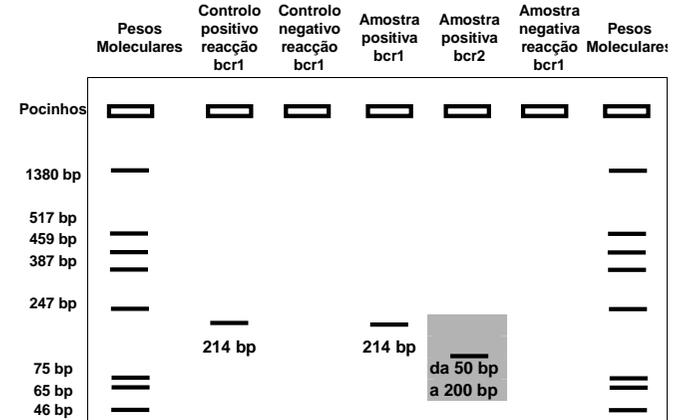
Os produtos específicos da segunda amplificação bcr3 tem dimensões de: **289 bp (PML-RARA bcr3)**

O produto específico da amplificação Controlo RARA tem dimensões de: **175 bp (RARA)**

Nota: O produto específico de amplificação do cDNA da translocação PML-RARA variante bcr2 pode ter dimensões diferentes nas diferentes amostras positivas, por causa da variabilidade do ponto de quebra no éxon 6 do gene PML.

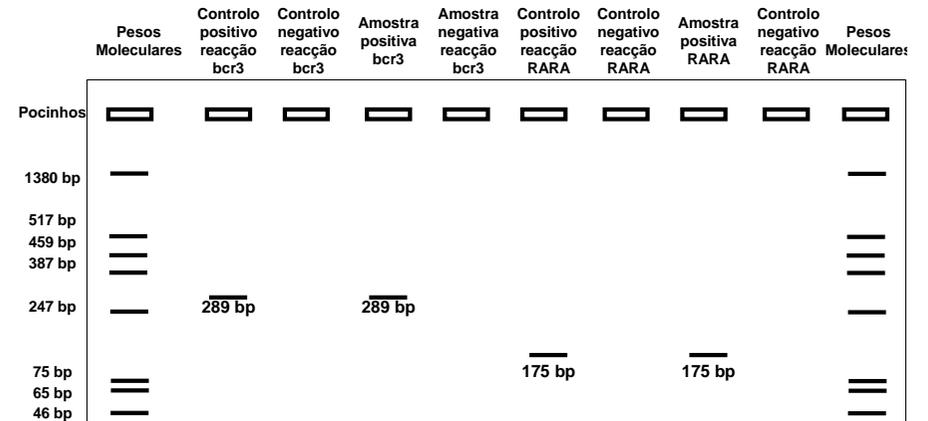
Nota: O produto da segunda amplificação pode contaminar os testes seguintes. Isolar o produto da segunda amplificação residuo e os descartes de produtos na fase de detecção.

A título de exemplo, está reproduzida a seguir uma ilustração esquemática que representa o resultado da separação electroforética de uma sessão de amplificação para a variante bcr1 e bcr2 em que foram analisadas amostras que apresentam os diversos perfis electroforéticos.



Nota: O produto específico de amplificação do cDNA da translocação PML-RARA variante bcr2 pode ter dimensões uma migração no gel diferente nas diversas amostras positivas em consequência da variabilidade do ponto de rotura no éxon 6 do gene PML.

A título de exemplo, está reproduzida a seguir uma ilustração esquemática que representa o resultado da separação electroforética de uma sessão de amplificação para a variante bcr3 e para o Controlo RARA em que foram analisadas amostras que apresentam os diversos perfis electroforéticos.



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 cDNA da translocação PML-RARA variantes bcr1, bcr2 e bcr3 e do cDNA do gene RARA.

Convalidação geral da sessão de amplificação

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 do controlo negativo	Amplificação
Produto específico AUSENTE	correcta

Amplificação do controlo positivo	Amplificação
Produto específico PRESENTE	correcta

Se o produto específico de amplificação está presente na reacção do controlo negativo, se são verificados problemas na fase de amplificação (contaminação) que podem causar resultados falsos positivos, a o teste deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Se o produto específico de amplificação está ausente na reacção do controlo positivo, se são verificados problemas na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou ausente) que podem causar resultados falsos negativos, o teste deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Interpretação dos resultados

Os resultados das reacções relativas às amostras em análise são utilizados para avaliar a presença do cDNA da translocação PML-RARA como descrito nas tabelas seguintes:

Amplificação da amostra	Resultado do teste	cDNA PML-RARA
Produto específico AUSENTE	negativo	AUSENTE
Produto específico PRESENTE	positivo	PRESENTE

Antes de convalidar definitivamente o resultado "cDNA de PML-RARA AUSENTE" para uma amostra é necessário analisar o resultado obtido com a amplificação de controlo para o cDNA do gene RARA na reacção relativa a esta amostra.

O resultado obtido para o cDNA do gene RARA é utilizado para realizar o controlo de idoneidade da amostra (controlo externo de qualidade), como descrito na tabela seguinte:

Amplificação da amostra	Resultado do teste	cDNA RARA	Amostra
Produto específico AUSENTE	negativo	PRESENTE	IDÓNEA
Produto específico PRESENTE	positivo	AUSENTE	NÃO IDÓNEA

Se o resultado da amplificação Controlo RARA é **negativo**, o cDNA do gene RARA está **AUSENTE** e a amostra é **NÃO IDÓNEA**, se foram verificados problemas na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou ausente), na fase de transcrição reversa (transcrição reversa não eficiente ou ausente) ou na fase de extracção (ausência de RNA ou presença de inibidores). A amostra é um **falso negativo** e o teste deve ser repetido a partir da extracção de uma nova amostra.

BIBLIOGRAFIA

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

PROBLEMAS E SOLUÇÕES

Produto específico de amplificação presente na reacção de controlo negativo

Possíveis causas	Soluções
Erro durante o deslocamento do cDNA	Abrir um tubo por vez, evitar derramar o conteúdo do tubo, trocar sempre as pontas
Erro durante o deslocamento do produto de primeira amplificação	Abrir um tubo por vez, evitar derramar o conteúdo do tubo, trocar sempre as pontas
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 aquoso, lavar as batas, substituir tubos e pontas em uso

Produto específico de amplificação ausente na reacção de Positive Control

Possíveis causas	Soluções
Enzima demasiadamente 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 demasiadamente 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 cDNA até a transferência no thermal - cycler.
Erro de programação do ciclo térmico	Controlar o ciclo térmico programado no thermal-cycler.
Excesso de cDNA na reacção	Estimar a concentração do RNA presente na reacção de transcrição reversa, não superar uma concentração de 40 ng / µL (1 µg de RNA em uma reacção de 25 µL finais)

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

Possíveis causas	Soluções
Presença de heparina na amostra de sangue inteiro	A amostra de sangue deve utilizar EDTA ou citrato como anticoagulantes.
Erro na conservação da amostra de sangue	O sangue deve ser tratado para a extracção do RNA 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 RNA deve ser realizada com material e reagentes sem a presença de RNase. O RNA extraído deve ser conservado a -20°C ou a -80°C .
Erro na fase de transcrição reversa	Controlar as operações de transcrição reversa. Preparar e realizar a transcrição reversa reacção, seguindo as instruções com muita atenção.
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 *in vitro*.
-  Conforme os requisitos da Directiva Europeia 98\79\CE relativo aos dispositivos médicos diagnósticos *in vitro*.
-  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.