

Elucigene[®] CF-EU2v1 Instruções de utilização

ELUCIGENE[®] é uma marca registada da Gen-Probe Life Sciences Ltd.

ARMS[®] é uma marca comercial registada da AstraZeneca UK Ltd.

QIAamp[®] é uma marca comercial registada do Qiagen Group.

Os kits Elucigene são desenvolvidos e fabricados pela Gen-Probe Life Sciences Ltd. em sistemas de qualidade acreditados segundo as normas ISO9001:2008 e ISO13485:2003.

GeneMarker[®] é uma marca comercial registada da SoftGenetics LLC.

GeneMapper[®] é uma marca comercial registada da Life Technologies Corporation.

VIC[®] and PET[®] são marcas comerciais registadas da Life Technologies Corporation.

NED[™], POP-6[™], POP-7[™] e Hi-Di[™] são marcas registadas da Life Technologies Corporation.

AVISO AO COMPRADOR: LICENÇA LIMITADA

Os polinucleóticos marcados com corantes VIC[®], NED[™] e PET[®] e/ou a sua utilização podem estar abrangidos por uma ou mais patentes detidas pela Applied Biosystems, LLC. O preço de aquisição deste produto inclui os direitos limitados e não transmissíveis ao abrigo de determinadas reivindicações de certas patentes detidas pela Applied Biosystems, LLC, para a utilização pelo comprador apenas desta quantidade do produto e exclusivamente em actividades de detecção de alvo(s) no domínio do diagnóstico humano. Não são transmitidos outros direitos. Podem obter-se mais informações acerca da aquisição de licenças relacionadas com os corantes atrás mencionados contactando o Director de Licenciamento da Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Califórnia 94404, EUA.

Fabricado pela Gen-Probe Life Sciences Ltd.
Heron House
Oaks Business Park
Crewe Road
Wythenshawe
Manchester
M23 9HZ

Para Vendas, Assistência ao Cliente e Assistência Técnica:

T: +49 (0) 6122 7076 451

F: +49 (0) 6122 7076 155

E: customerservice@gen-probe.eu

E: technicalsupport@gen-probe.eu

Copyright © 2011 Gen-Probe Life Sciences Ltd.



Elucigene CF-EU2v1

Cód. cat.: CF2EUB2 – 50 testes

Utilização prevista

Para a deteção qualitativa simultânea in vitro das seguintes mutações do gene Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) (Regulador da condutância transmembranar na fibrose cística) responsáveis pela fibrose cística em humanos em DNA extraído de sangue total (conservado em EDTA) e amostras de gotas de sangue secas:

| Tradicional | De acordo com as orientações da HGVS | Tradicional | De acordo com as orientações da HGVS |
|-------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------------------|
| CFTRdele2,3 | c.54-5940_273+1025del21kb | G551D | c.1652G>A; p.Gly551Asp |
| E60X | c.178G>T; p.Glu60X | R553X | c.1657C>T; p.Arg553X |
| P67L | c.200C>T; p.Pro67Leu | R560T | c.1679G>C; p.Arg560Thr |
| G85E | c.254G>A; p.Gly85Glu | 1811+1.6kbA>G | c.1679+1.6kbA>G |
| 394delTT | c.262_263delTT; p.Leu88Ilefs*22 | 1898+1G>A | c.1766+1G>A |
| 444delA | c.313delA; p.Ile105Serfs*2 | 2143delT | c.2010delT; p.Leu671X |
| R117C | c.349C>T; p.Arg117Cys | 2184delA | c.2052delA; p.Lys684fs |
| R117H | c.350G>A; p.Arg117His | 2347delG | c.2215delG; p.Val739Tyrfs*16 |
| Y122X | c.366T>A; p.Tyr122X | W846X | c.2538G>A; p.Trp846X |
| 621+1G>T | c.489+1G>T | 2789+5G>A | c.2657+5G>A |
| 711+1G>T | c.579+1G>T | Q890X | c.2668C>T; p.Gln890X |
| L206W | c.617T>G; p.Leu206Trp | 3120+1G>A | c.2988+1G>A |
| 1078delT | c.948delT; p.Phe316fs | 3272-26A>G | c.3140-26A>G |
| R334W | c.1000C>T; p.Arg334Trp | R1066C | c.3196C>T; p.Arg1066Cys |
| R347P | c.1040G>C; p.Arg347Pro | Y1092X(C>A) | c.3276C>A; p.Tyr1092X |
| R347H | c.1040G>A; p.Arg347His | M1101K | c.3302T>A; p.Met1101Lys |
| A455E | c.1364C>A; p.Ala455Glu | D1152H | c.3454G>C; p.Asp1152His |

| Tradicional | De acordo com as orientações da HGVS | Tradicional | De acordo com as orientações da HGVS |
|-------------|--------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| I507del | c.1519_1521delATC; p.Ile507del | R1158X | c.3472C>T; p.Arg1158X |
| F508del | c.1521_1523delCTT; p.Phe508del | R1162X | c.3484C>T; p.Arg1162X |
| 1677delTA | c.1545_1546delTA; p.Tyr515X | 3659delC | c.3528delC; p.Lys1177fs |
| V520F | c.1558G>T; p.Val 520Phe | 3849+10kbC>T | c.3717+10kbC>T |
| 1717-1G>A | c.1585-1G>A | S1251N | c.3752G>A; p.Ser1251Asn |
| G542X | c.1624G>T; p.Gly542X | 3905insT | c.3773dupT; p.Leu1258fs |
| S549R(T>G) | c.1647T>G; p.Ser549Arg | W1282X | c.3846G>A; p.Trp1282X |
| S549N | c.1646G>A; p.Ser549Asn | N1303K | c.3909C>G; p.Asn1303Lys |

O CF-EU2v1 é capaz de distinguir entre indivíduos heterozigóticos e homozigóticos relativamente a todas as mutações e variantes acima, à excepção de S549R(T>G).

Resumo e explicação

A fibrose cística (FC) é a patologia autossómica recessiva limitante mais comum entre a população caucasiana. A incidência da doença é de 1:3200 nados-vivos nesta etnia (1). Na população caucasiana, a frequência de heterozigóticos é de aproximadamente 1:25.

A fibrose cística afecta o epitélio de diversos órgãos, resultando numa doença complexa e multissistémica que envolve o pâncreas exócrino, os intestinos, o aparelho respiratório, o aparelho genital masculino, o sistema hepatobiliar e as glândulas sudoríparas exócrinas. A expressão da doença varia segundo a gravidade das mutações do *CFTR* (2), dos modificadores genéticos (3) e dos factores ambientais (4). Esta gravidade varia desde morte no início da infância em resultado de doença pulmonar obstrutiva progressiva com broncoectasia, até insuficiência pancreática com doença pulmonar obstrutiva gradualmente progressiva durante a adolescência e aumento da frequência de hospitalizações motivadas por doenças pulmonares no início da idade adulta e até sinusite e bronquite recorrentes ou infertilidade masculina no início da idade adulta.

Habitualmente, o diagnóstico de fibrose cística é estabelecido em indivíduos com uma ou mais características fenotípicas de CF e dados de uma anomalia na função do *CFTR* com base em um dos seguintes aspectos: presença de duas mutações causadoras de doença no gene *CFTR* ou dois valores quantitativos anormais de cloro na iontoforese da transpiração estimulada pela pilocarpina (>60 mEq/l) ou determinações da diferença de potencial nasal transepitelial (NPD) características de CF. A taxa de detecção da mutação do *CFTR* varia segundo o método analítico e a herança étnica. Em alguns indivíduos sintomáticos, apenas se detecta uma ou nenhuma mutação causadora de doença; em alguns portadores, a mutação causadora de doença não é detectável.

As doenças relacionadas com o CFTR são transmitidas de forma autossómica recessiva. Irmãos de um probando com fibrose cística têm uma probabilidade de 25% de estarem afectados, uma probabilidade de 50% de serem portadores assintomáticos e uma probabilidade de 25% de serem não-afectados e não portadores. Os testes de genética molecular de mutações causadoras de doença(s) no gene CFTR são utilizados para a detecção de portadores em programas de rastreio na população. Existem testes pré-natais para gravidezes com maior risco de sofrer anomalias relacionadas com o CFTR se forem conhecidas mutações causadoras de doença na família.

Desde a descoberta do gene CFTR, em 1989 (5), foram descritas mais de 1700 mutações e variantes do gene (6). Muitas destas mutações são «privadas», tendo sido descritas apenas num doente e/ou família. As análises de rotina de todas as mutações possíveis não são exequíveis nem rentáveis, estando assim confinadas à análise das mutações mais comuns. O CF-EU2v1 é um kit de testes da fibrose cística concebido especificamente para analisar as mutações mais comuns nas populações de origem europeia. No total, o ensaio identifica 50 mutações e analisa ainda o segmento poli-T do intrão 8 através da determinação exacta da repetição de TG adjacente.

O segmento polimórfico de timidina que se encontra na junção entre o intrão 8 e o exão 9 influencia a transcrição. O número de resíduos de timidina (5T, 7T ou 9T) afecta a eficiência de splicing do exão 9; se estiver presente o alelo 5T, estará ausente uma proporção dos produtos da transcrição do exão 9, que resulta em proteínas não funcionais e sintomas de CF variáveis. Há relatos de que o número de repetições de TG na extremidade 5' do segmento de politimidina pode também influenciar o splicing to exão 9 (7). Se presentes no mesmo alelo da variante 5T, quanto maior for o número de repetições de TG, maior a proporção de produtos de transcrição do CFTR que não possuem o exão 9. O número de repetições de TG pode ser determinado utilizando com o CF-EU2v1 medindo os picos dos produtos de amplificação de 5T.

Princípios do procedimento

O método utilizado pelo kit Elucigene CF-EU2v1 utiliza uma tecnologia ARMS (Amplification Refractory Mutation System, sistema de mutação refractária à amplificação) de fluorescência para amplificação específica de alelos, que detecta mutações, inserções ou deleções pontuais no ácido desoxirribonucleico (DNA) (8). O princípio do ARMS é que os oligonucleótidos com um resíduo não correspondente na extremidade 3' não funcionam como iniciadores da reacção em cadeia da polimerase (PCR) em condições específicas. A selecção de oligonucleótidos adequados permite a amplificação e detecção de sequências de DNA mutantes ou normais específicas.

Advertências e precauções

1. Para fins de diagnóstico in vitro.
2. O controlo de DNA fornecido com este kit é de origem humana e foi analisado independentemente com um ensaio de PCR, tendo-se verificado que é negativo para o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV) e o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV1).
3. Há que ter cautela quando se manuseia material de origem humana. Todas as amostras devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Nenhum método de teste pode garantir totalmente a ausência de HBV, HCV, HIV1 ou de outros agentes infecciosos. O manuseamento das amostras e dos componentes dos testes, a sua utilização, o seu armazenamento e a sua eliminação devem estar de acordo com os procedimentos definidos pelas orientações ou regulamentos nacionais de segurança biológica.

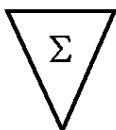
4. Armazene todos os componentes abaixo de -20 °C e no escuro. Os corantes fluorescentes utilizados neste produto são fotossensíveis, evite a exposição prolongada à luz. Elimine 3 meses após a abertura, excepto se dividido em subalíquotas.
5. De acordo bom as boas práticas de laboratório actuais e para que se possa avaliar a validade do procedimento, os laboratórios devem processar em cada ensaio as suas próprias amostras de QC interno de genótipo conhecido.

Símbolos utilizados nos rótulos

Os símbolos utilizados em todos os rótulos e embalagens estão em conformidade com a norma EN 980 harmonizada.



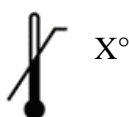
Fabricante



Número de análises



Consulte as instruções de utilização



Armazene abaixo da temperatura indicada



Utilize até à data indicada



Código de catálogo



Número de lote

Materiais fornecidos

Os reagentes devem ser armazenados em áreas isentas de DNA ou produtos de PCR contaminantes.

Todos os reagentes são fornecidos prontos a utilizar. Armazene os reagentes abertos e por abrir a -20 °C. Os reagentes abertos podem ser armazenados durante até 3 meses.

São fornecidos materiais suficientes para 50 análises:

2 x ampola de 120 µl de mistura de reacção A para CF-EU2v1, contendo iniciadores para amplificar os seguintes alelos mutantes R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, F508del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X e R1158X. Esta mistura contém também iniciadores de estirpe selvagem para a detecção do alelo F508del normal, iniciadores para a detecção das variantes de politimidina, IVS8-5T, IVS8-7T e IVS8-9T, e iniciadores para a identificação de dois marcadores STR hipervariáveis – (CF2EUTA).

2 x ampola de 120 µl de mistura de reacção B para CF-EU2v1, contendo iniciadores de estirpe selvagem para amplificar os seguintes alelos normais R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X e R1158X. Esta mistura contém ainda iniciadores para a identificação de dois marcadores STR hipervariáveis – (CF2EUTB).

2 x ampola de 400 µl s de mistura principal para PCR contendo DNA polimerase HotStartTaq e trifosfatos de desoxinucleótidos em tampão – (CR000TM).

1 x ampola de 50 µl de controlo de DNA, normal para as mutações detectadas pelo Elucigene CF-EU2v1 – (CR006TX)

Materiais necessários, mas não fornecidos

Consumíveis de laboratório – luvas, tubos de microcentrifuga de tampa de rosca; ampolas para PCR de 0,2 ml; pontas de pipeta.

Preparação do DNA – QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, N.º Cat. 51304/51306) ou equivalente.

Electroforese de capilares – padrão de tamanho GeneScan 600 LIZ (N.º Cat. ABI 4366589), padrão de tamanho GeneScan 600v2 LIZ (N.º Cat. ABI 4408399), padrão de matriz multicapilares DS-33 (conjunto de corantes G5) (N.º Cat. ABI 4345833), Polímero POP-6 (N.º Cat. ABI 4316357) ou polímero POP-7 (N.º Cat. ABI 4352759), 10x tampão para analisador genético (N.º Cat. ABI 402824) e formamida Hi-Di (ABI N.º Cat. 4311320).

Equipamento Necessário

Equipamento de laboratório – pipetas de precisão (2 conjuntos: 1 para utilizar antes da amplificação e 1 para depois da amplificação: de preferência, pipetas de deslocação positiva); vestuário de protecção, agitador vórtex; microcentrífuga; centrífuga de placas de microtitulação de 96 poços.

Amplificação por PCR – Termociclador onde caibam placas de microtitulação de 96 poços ou ampolas de 0,2 ml, com exactidão da temperatura de +/-1 °C entre 33 °C e 100 °C e uniformidade da temperatura estática de +/-1 °C.

Electroforese de capilares – Analisador genético ABI 3100/3130/3500 (com software de análise de fragmentos), matriz de capilares de 36 cm ou 50 cm (ABI3500), placas ópticas de 96 poços, septos de 96 poços, cassetes de 96 poços.

Colheita e armazenamento de amostras

Pode utilizar-se sangue total (EDTA) e gotas de sangue seco.

Há relatos de alguns casos em que dispositivos de colheita de amostras afectaram a integridade de determinados analitos e podem interferir com as tecnologias de alguns métodos (9). Recomenda-se que cada utilizador zeze para que o dispositivo escolhido é utilizado de acordo com as instruções do fabricante e que os dispositivos de colheita de amostras são compatíveis com este teste.

As amostras de sangue devem ser armazenadas a -20 °C antes da preparação do DNA. Evite congelar e descongelar repetidas vezes.

Preparação de DNA a partir de amostras de sangue total (EDTA)

São obtidos resultados consistentes com o DNA extraído por meio do QIAamp 96 DNA Blood Kit (ou o QIAamp DNA Mini Kit com Proteinase K) seguindo o protocolo descrito no Manual QIAamp, partindo de 200 µl de sangue total líquido e eluindo-o em 200 µl de água de pureza adequada a biologia molecular.

Preparação de DNA a partir de gotas de sangue seco

São obtidos resultados consistentes com o DNA extraído por meio do QIAamp DNA Mini Kit seguindo o protocolo descrito no Manual QIAamp, mas partindo de discos de 2 x 3 mm de uma gota de sangue seco e eluindo-os em 100 µl de água de pureza adequada a biologia molecular.

Tanto o QIAamp DNA Mini Kit como o QIAamp 96 DNA Blood Kit foram utilizados com êxito na extracção de DNA.

Em condições de PCR ideais e utilizando as definições de injeccção de amostras recomendadas (consulte a nota na secção de electroforese de capilares) indicadas nos módulos de execução de colunas de capilares, obtêm-se resultados consistentes com DNA extraído utilizando o QIAamp DNA Mini Kit e o QIAamp 96 DNA Blood Kit. Para amostras com concentração de DNA inferior, pode utilizar-se um maior volume de água para a eluição. Para amostras com concentração de DNA maior, pode utilizar-se um menor volume de água para a eluição.

Foram obtidos por rotina resultados aceitáveis com DNA extraído pelos métodos acima a concentrações entre 1,5 ng/ul e 25 ng/ul.

Recomenda-se que métodos de extracção de DNA e tipos de amostra alternativos sejam cabalmente avaliados com o teste Elucigene CF-EU2v1 antes de os resultados serem utilizados para fins de diagnóstico.

Protocolo do ensaio

Procedimento de amplificação

Nota: Para minimizar o risco de contaminação, as etapas 3 – 5 têm de ser realizadas numa área isenta de produtos de PCR. É necessário incluir-se um controlo negativo em cada execução de PCR.

1. Programe o termociclador para um ciclo de etapa única para activar o HotStart Taq a 94 °C, durante 20 minutos, ligado a um programa de ciclos de amplificação de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 2 minutos a 58 °C (hibridação) e 1 minuto a 72 °C (extensão) para 30 ciclos. Este deve estar ligado a um ficheiro de tempo de atraso de 20 minutos a 72 °C (extensão) no ciclo final.
2. É necessário incluir-se um controlo negativo em cada execução de PCR.
3. Descongele as misturas de iniciadores e a mistura principal para PCR e centrifugue um pouco para recolher o conteúdo do fundo das ampolas. Agite suavemente no vórtex para misturar e volte a centrifugar um pouco as ampolas. Prepare mistura de reacção suficiente para o número de amostras e controlos a testar (Tabela 1).

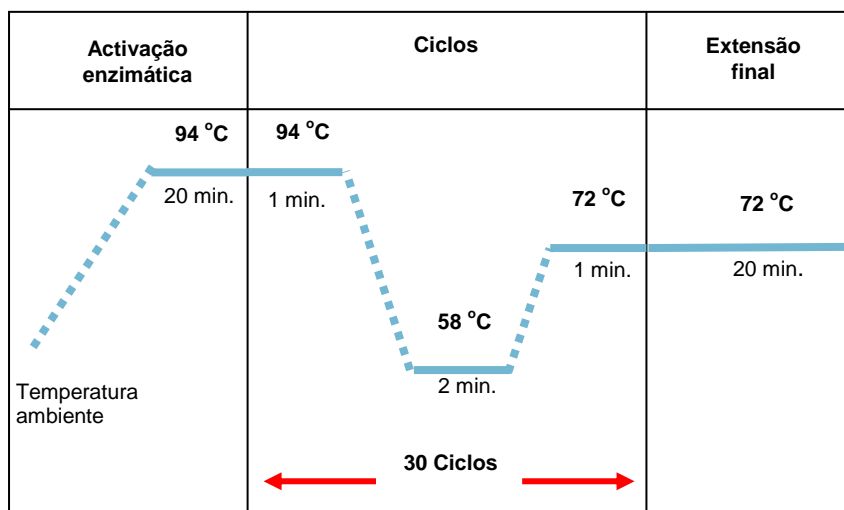


Tabela 1: Formulação da mistura de reacção

| | Número de amostras a testar | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-----|-------|-----|
| | 1 | 10 | 25 | 50 |
| Mistura de iniciadores (µl) | 4,5 | 45 | 112,5 | 225 |
| Mistura principal para PCR (µl) | 7,5 | 75 | 187,5 | 375 |
| Total (µl) | 12 | 120 | 300 | 600 |

4. Pipete 10 µl de cada mistura de reacção para o fundo de ampolas para PCR de 0,2 ml devidamente rotuladas.
5. Utilizando pontas de pipeta distintas, adicione 2,5 µl de amostra de DNA de teste a cada uma das ampolas e coloque a tampa. Não adicione DNA à ampola para controlo negativo, substitua por 2,5 µl de água desionizada esterilizada.
6. Centrifugue um pouco as ampolas de PCR para recolher o conteúdo do fundo das ampolas.
7. Coloque firmemente as ampolas no bloco do termociclador. Inicie o ciclo de etapa única de 94 °C, seguido do programa de ciclos de amplificação.

- Concluído o programa de ciclos de amplificação, as amostras podem ser armazenadas durante a noite à temperatura ambiente ou a 2 °C - 8 °C, durante 7 dias, até à análise por electroforese de capilares.

Electroforese de capilares

Recomenda-se que cada utilizador zele para que o equipamento escolhido é utilizado de acordo com as instruções do fabricante e que é compatível com este teste. Neste contexto, os parâmetros principais são o polímero e a matriz de capilares. Podem obter-se os melhores resultados nas seguintes condições de electroforese de capilares:

- Combine 6,8 µl de padrão de tamanho GS600v2 LIZ com 250 µl de formamida Hi-Di e misture bem (mistura suficiente para 16 poços). Distribua 15 µl da mistura por cada poço de uma placa óptica de 96 poços.
- Adicione 3 µl de produto de PCR à mistura de padrão de tamanho (da etapa 1) já distribuída na placa.
- Desnature o produto de PCR distribuído na placa óptica num termociclador utilizando os seguintes parâmetros: 94 °C durante 3 minutos ligado a 4 °C durante 30 segundos.
- Centrifugue um pouco a placa para recolher o conteúdo no fundo das ampolas e para remover eventuais bolhas existentes nos poços e, de seguida, carregue no analisador genético.

Nota: As definições de injeção de amostras podem ser modificadas consoante a quantidade de produto de amplificação produzido durante a PCR, que pode variar devido à quantidade de DNA genómico inicialmente introduzida. Pode aplicar-se menos produto de amplificação à coluna para análise reduzindo o tempo ou a tensão de injeção. Inversamente, pode aplicar-se mais produto de amplificação à coluna para análise aumentando o tempo ou a tensão de injeção. Amostras previamente amplificadas podem ser reinjectadas diversas vezes para reanálise.

Instrumentos ABI 3100:

É necessário criar um módulo de CF-EU2, que pode depois ser utilizado em cada execução de CF-EU2.

- Crie o módulo de CF-EU2 no editor de módulos do software de recolha de dados do 3100.
- Assegure-se de que GeneScan36_POP6 foi escolhido como modelo.
- Insira as definições descritas na tabela abaixo:

Módulo de capilares de 36 cm

| # | Nome do parâmetro | Valor | Intervalo |
|----|--|-------|---------------------|
| 1 | Run Temperature (Temperatura de execução) | 60 | int 18...65 °C |
| 2 | Cap Fill Volume (Volume de enchimento até tampa) | 184 | int 1...200 etapas |
| 3 | Current Tolerance (Tolerância de corrente) | 100 | int 1...100 uA |
| 4 | Run Current (Corrente da execução) | 100 | int 1...200 uA |
| 5 | Voltage Tolerance (Tolerância de tensão) | 0,6 | flut 0,25...2,0 kVs |
| 6 | Pre Run Voltage (Tensão pré-execução) | 15 | flut 0,25...15 kV |
| 7 | Pre Run Time (Tempo pré-execução) | 180 | int 1...1000 s |
| 8 | Injection Voltage (Tensão de injeção) | 3 | flut 0,25...15 kV |
| 9 | Injection Time (Tempo de injeção) | 12 | int 1...600 s |
| 10 | Run voltage (Tensão de execução) | 15 | flut 0,25...15 kV |
| 11 | Number of Steps (Número de etapas) | 10 | int 1...100 nk |
| 12 | Voltage Step Interval (Intervalo dos passos de tensão) | 20 | int 1...60 s |
| 13 | Data Delay Time (Tempo de atraso dos dados) | 1 | int 1...3600 s |
| 14 | Run Time (Tempo de execução) | 3000 | int 300...14000 s |

Nota: O run time (tempo de execução) necessário varia consoante a temperatura ambiente do local onde o analisador genético está instalado. Para mais informações acerca da criação de módulos de execução, queira consultar o manual de utilização do seu aparelho.

Para executar as amostras, crie uma ficha de amostras utilizando o editor de placas. Certifique-se de que são seleccionadas as seguintes características:

- Corante: Laranja
- Conjunto de corantes: G5
- Módulo da execução: CF-EU2 (ver acima)

Instrumentos ABI 3130:

É necessário criar um módulo de execução e um protocolo para CF-EU2, que podem depois ser utilizados em cada execução de CF-EU2.

Crie o módulo execução de CF-EU2 no gestor de módulos do software de recolha de dados 3130. Certifique-se de que são seleccionadas as seguintes características:

- Tipo: regular
- Modelo: FragmentAnalysis36_POP7
- Insira as definições descritas na tabela abaixo:

Módulo de capilares de 36 cm

| # | Nome do parâmetro | Valor | Intervalo |
|----|---|-------|---------------------|
| 1 | Oven Temperature (Temperatura da estufa) | 60 | int 18...65 °C |
| 2 | Poly_Fill_Vol. (Vol_Ench_Poli) | 6500 | 6500...38000 etapas |
| 3 | Current Stability (Estabilidade da corrente) | 5,0 | int 0...2000 uA |
| 4 | PreRun_Voltage (Tensão_pré-execução) | 15,0 | 0...15 kV |
| 5 | Pre_Run_Time (Tempo_pré-execução) | 180 | 1...1000 s |
| 6 | Injection_Voltage (Tensão_injecção) | 3,0 | 1...15 kV |
| 7 | Injection_Time (Tempo_injecção) | 12,0 | 1...600 s |
| 8 | Voltage_Number_Of_Steps (Tensão_Número_de_etapas) | 20 | 1...100 nk |
| 9 | Voltage_Step_Interval (Intervalo_passos_tensão) | 15 | 1...60 s |
| 10 | Data_Delay_Time (Tempo_atraso_dados) | 60 | 1...3600 s |
| 11 | Run_Voltage (Tensão_execução) | 15,0 | 0...15 kVs |
| 12 | Run_Time (Tempo_execução) | 1200 | 300...14000 s |

Nota: O run time (tempo de execução) necessário varia consoante a temperatura ambiente do local onde o analisador genético está instalado. Para mais informações acerca da criação de módulos de execução, queira consultar o manual de utilização do seu instrumento.

Crie o protocolo para CF-EU2 no gestor de protocolos e assegure-se de que selecciona as seguintes características:

- Tipo: regular
- Módulo de execução: CF-EU2 (ver modulo de execução acima)
- Conjunto de corantes: G5

Para executar as amostras, crie uma ficha de amostras utilizando o gestor de placas e assegure-se de que foi seleccionado o protocolo correcto para CF-EU2v1 para o protocolo do instrumento (ver acima).

Instrumentos ABI 3500:

É necessário criar um protocolo do instrumento para CF-EU2, que pode depois ser utilizado em cada execução de CF-EU2v1.

Crie o protocolo do instrumento para CF-EU2 através da biblioteca de protocolos do instrumento 3500. Certifique-se de que são seleccionadas as seguintes características:

- Módulo da execução: FragmentAnalysis50_POP7
- Insira as definições descritas na imagem abaixo:

Application Type: Fragment Capillary Length: 50 cm Polymer: POP7

Dye Set: G5

Instrument Protocol Properties

* Run Module: FragmentAnalysis50_POP7

* Protocol Name: CFEU2

Description:

Oven Temperature (°C): 60 Run Voltage (kVolts): 19.5 PreRun Voltage (kVolts): 15 Injection Voltage (kVolts): 3

Run Time (sec.): 1200 PreRun Time (sec.): 180 Injection Time (sec.): 12 Data Delay (sec.): 1

Advanced Options

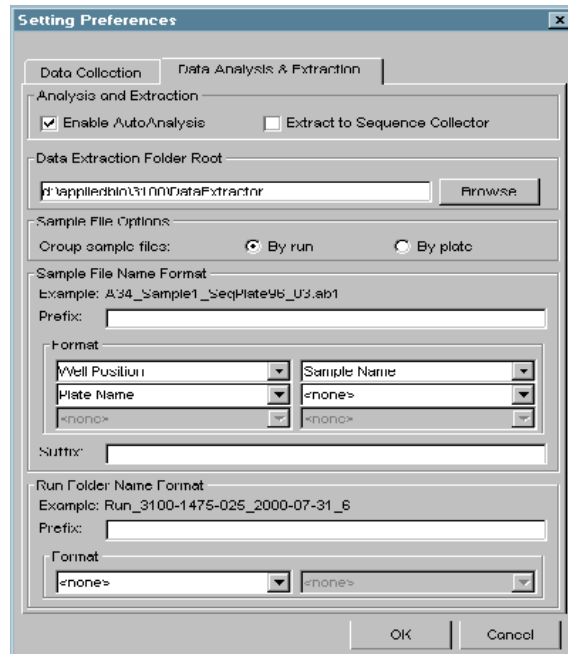
Close Save

Para executar as amostras, crie uma placa de amostras clicando em '**Create Plate from Template**' (Criar placa a partir de modelo) no '**Dashboard**' (Painel) e assegure-se de que foi atribuído o protocolo do instrumento correcto para CF-EU2v1 (ver acima).

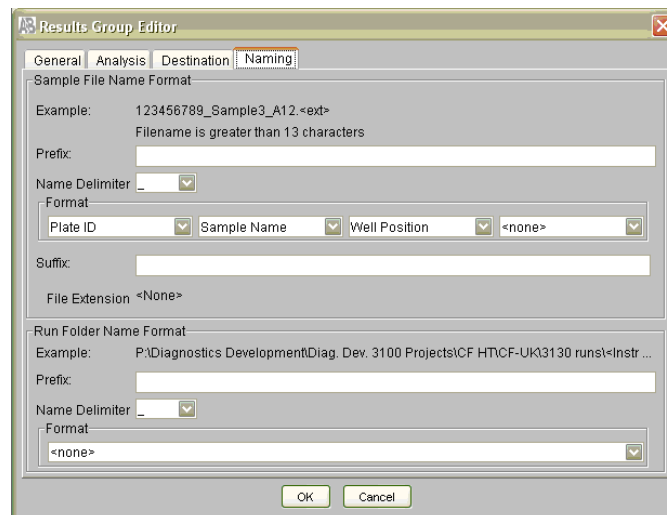
Definição da ficha de amostras para o GeneMarker:

O software GeneMarker permite a comparação directa entre dados A e B do mesmo indivíduo. Para que tal possa ser feito facilmente, é importante que a atribuição de nomes aos ficheiros fsa seja coerente em todas as amostras e misturas. A ficha de amostras deve conter o nome único da amostra para cada amostra a testar, adicionando-se o sufixo _A ou _B consoante a mistura testada. Caso se pretenda incluir a identificação da placa no nome do fsa, deve utilizar-se sempre um formato fixo, p. ex., CFEU2 DDMMAAAA.

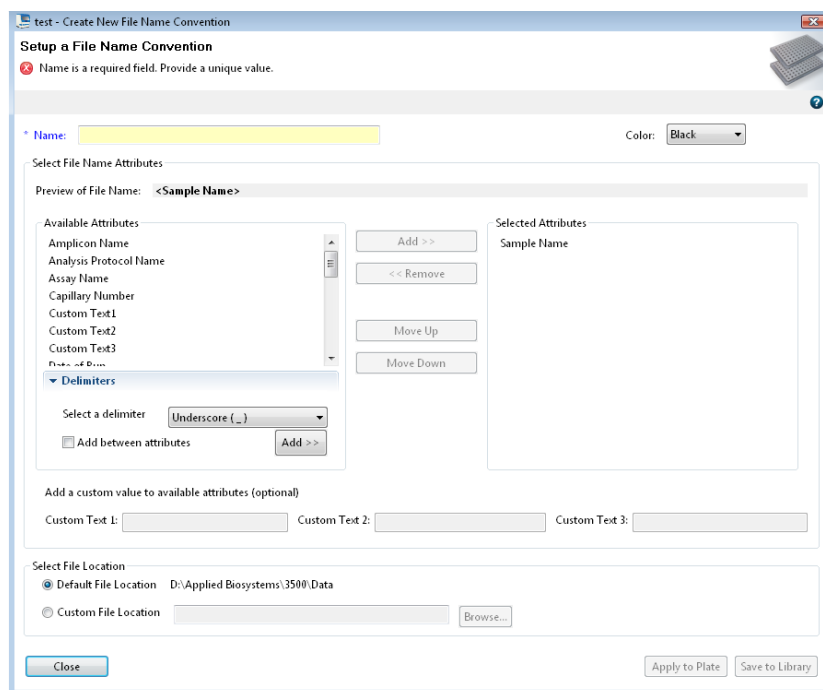
No instrumento **3100** as 'Setting Preferences' (Preferências de definições) devem ser definidas de modo a que o nome da amostra seja incluído no nome do ficheiro fsa, p. ex., A01_1234,5_A_CFEU2 DDMMAAAA.



No instrumento **3130** os parâmetros do 'Results Destination' (Destino dos resultados) devem ser definidos de modo a que o nome da amostra seja incluído no nome do ficheiro fsa, p. ex., CFEU2 DDMMAAAA_1234,5_A_A01.



No instrumento **3500**, a convenção do nome do ficheiro deve ser definida de modo a que o nome da amostra seja incluído no nome do ficheiro fsa, p. ex., CFEU2 DDMMAAAA_1234,5_A_A01.



Interpretação dos resultados

Durante a recolha de dados, os fragmentos de PCR são observados sob a forma de picos azuis (mutantes) ou verdes (estirpe selvagem) no electroforograma de dados não tratados. Cada indivíduo possui duas cópias do gene CFTR. Quando estas cópias possuem a mesma sequência num dado local, diz-se que o indivíduo é homozigótico relativamente a este local. Quando estas cópias possuem sequências diferentes num dado local, diz-se que o indivíduo é heterozigótico relativamente a este local.

Depois de terminar a colheita de dados, os fragmentos de PCR de CF-EU2v1 devem ser medidos frente ao padrão de tamanho GS600v2 LIZ utilizando o software de análise de fragmentos.

O Guia do software de análise do Elucigene CF-EU2v1 apresenta mais orientações detalhadas acerca das definições do software, da análise e a interpretação. O sítio Web da Gen-Probe disponibiliza procedimentos do Guia do software de análise para os softwares GeneMapper e para o GeneMarker: www.gen-probe.com

A mistura A (mutante) determina se um indivíduo é portador de alguma mutação, o que é mostrado pela presença de um pico azul. A mistura mutante contém também iniciadores do alelo normal F508del, pelo que esta mistura consegue determinar se um indivíduo apresenta F508del normal (apenas pico verde), se é homozigótico para F508del (apenas pico azul) ou se é heterozigótico para este alelo (pico azul e pico verde).

Se for observada qualquer outra mutação, a amostra pode ser amplificada com a mistura B (WT) para determinar se é homozigótica ou heterozigótica. A presença de um pico verde para um determinado alelo na mistura WT indica que o indivíduo é heterozigótico e a ausência de um pico verde indica que é homozigótico para aquela mutação em particular.

São incluídos marcadores STR hipervariáveis (vermelhos) em ambas as misturas. Isto permite a comparação entre a amostra amplificada com a mistura mutante e a amostra amplificada com a mistura WT para reduzir a probabilidade de as amostras serem confundidas; um perfil STR diferente em cada uma das duas misturas indica que houve confusão de amostras. A ausência destes marcadores STR indica que a amostra falhou. A presença de marcadores STR com RFU muito baixas indica uma amostra fraca, que deve ser analisada com cautela.

Nota: Consulte o Guia de resolução de problemas no Apêndice 1.

Marcadores detectados

A tabela que se segue resume os marcadores detectados pela mistura CF-EU2v1. Os marcadores são indicados por intervalo de tamanhos do produto de PCR observado.

Marcadores detectados

| N.º Marcador | Marcador | Intervalo de tamanho em bp do produto (dados 3130/POP7) |
|--------------|---------------|---|
| 01 | R347H | 110.5-116.5 |
| 02 | R347P | 117-123 |
| 03 | 2789+5G>A | 124-130 |
| 04 | 3120+1G>A | 132.5-138.5 |
| 05 | 711+1G>T | 141.5-147.5 |
| 06 | R334W | 147.5-154 |
| 07 | I507del | 156-162.5 |
| 08 | F508del | 163-169 |
| 09 | 3849+10KbC>T | 172-178 |
| 10 | 1677delTA | 180-188 |
| 11 | 1078delT | 193-199 |
| 12 | V520F | 205-214 |
| 13 | L206W | 219-222 |
| 14 | W1282X | 224.5-230.5 |
| 15 | R560T | 234.5-240.5 |
| 16 | 2347delG | 242-247 |
| 17 | Q890X | 250-255 |
| 18 | R553X | 255.5-261.5 |
| 19 | G551D | 264-270 |
| 20 | S549R(T>G)* | 267.5-269 |
| 21 | S549N | 275-280 |
| 22 | M1101K | 282-288 |
| 23 | G542X | 289-295.5 |
| 24 | 3905insT | 297-303.5 |
| 25 | Y1092X(C>A) | 308-314 |
| 26 | S1251N | 315-321 |
| 27 | 444delA | 323-330 |
| 28 | 1811+1.6kbA>G | 332-338 |
| 29 | 1717-1G>A | 341.5-347.5 |
| 30 | R117H | 349-355 |
| 31 | R117C | 357-361 |
| 32 | N1303K | 360-366.5 |
| 33 | Y122X | 367-373 |
| 34 | 394delTT | 377-383 |
| 35 | G85E | 384-390 |
| 36 | R1066C | 391-397 |
| 37 | 1898+1G>A | 398.5-404.5 |
| 38 | W846X | 406-411 |
| 39 | 2184delA | 413-419.5 |
| 40 | D1152H | 423-429 |
| 41 | CFTRdel2,3 | 433-439 |
| 42 | P67L | 439.5-445.5 |
| 43 | 2143delT | 447-451.5 |
| 44 | E60X | 453.5-460.5 |
| 45 | 3659delC | 461-466.5 |
| 46 | 3272-26A>G | 470-476 |
| 47 | 621+1G>T | 485.5-491.5 |

| N.º Marcador | Marcador | Intervalo de tamanho em bp do produto (dados 3130/POP7) |
|--------------|----------|---|
| 48 | A455E | 496-503 |
| 49 | R1162X | 506-512 |
| 50 | R1158X | 518.5-524.5 |
| 5T** | IVS8-5T | 110-130 |
| 7T | IVS8-7T | 140-160 |
| 9T | IVS8-9T | 175-195 |

***S549R(T>G)**

O pico 20 só está presente na mistura A.

**** Tamanhos de alelos 5T**

| Marcador | Intervalo de tamanho em bp do produto (3130/dados POP7) |
|----------|---|
| 5T (9) | 117,25 – 118,75 |
| 5T (10) | 119,25 – 120,75 |
| 5T (11) | 121,25 – 122,75 |
| 5T (12) | 123,25 – 124,75 |
| 5T (13) | 125,25 – 126,75 |

NOTA: Os tamanhos dos marcadores podem variar consoante o aparelho e o polímero utilizados.

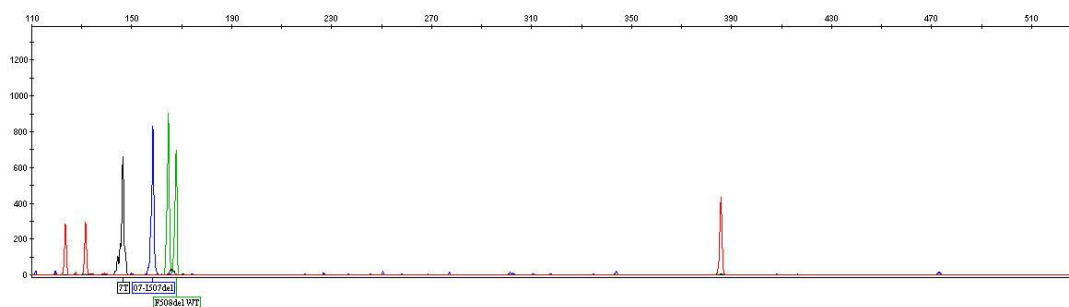
Exemplos de interpretação

I507del

Devido à localização da deleção I507del no gene CFTR, é possível detectar a presença deste marcador através de um desvio de 3 bp no tamanho do pico de F508del, assim como um pico específico da mutação I507del.

Caso esteja presente um só alelo mutante I507del, o pico mutante que lhe corresponde será observado sob a forma de um pico azul a aproximadamente 159 bp. Será observado como presente um pico de estirpe selvagem para F508del, mas a altura do pico será cerca de metade da normalmente associada a um genótipo de estirpe selvagem homocigótico; este é observado sob a forma de um pico verde a cerca de 167 bp. Observar-se-á ainda um outro pico verde a cerca de 164 bp.

Amostra heterocigótica I507del

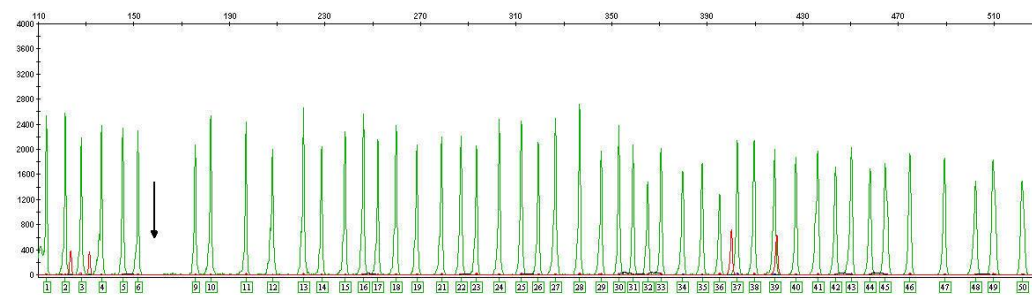


Uma amostra I507del/F508del produz um pico WT F508del verde desviado a aproximadamente 164 bp (menos 3 bp que o normal), um pico M F508del azul a 166 bp e um pico M I507del azul a cerca de 159 bp.

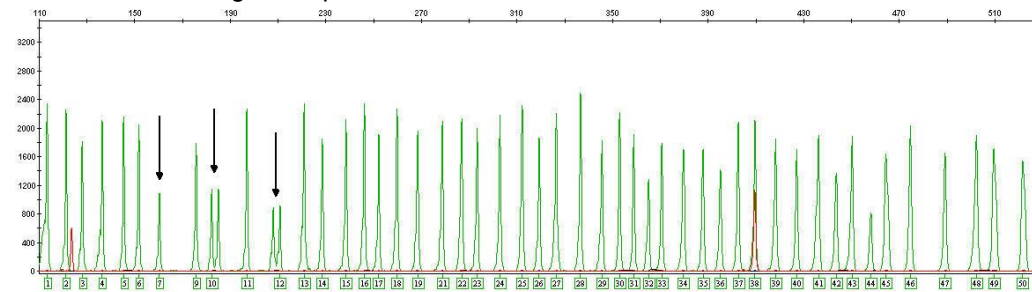
Uma amostra I507del/I507del resulta num pico azul a aproximadamente 159 bp e num pico verde único a cerca de 164 bp (3 bp inferior ao pico F508del normal observado quando I507del não está presente).

F508del

A presença de uma mutação F508del impede o iniciador WT I507del de funcionar. Consequentemente, um indivíduo homocigótico para F508del não apresenta um pico WT I507del na mistura WT (ver abaixo).



Um pico WT I507 de altura reduzida e dois picos com 3 bp de intervalo, nas posições 10 e 12 da mistura WT (ver abaixo) são observados nos resultados da mistura B para indivíduos heterocigóticos para F508del.



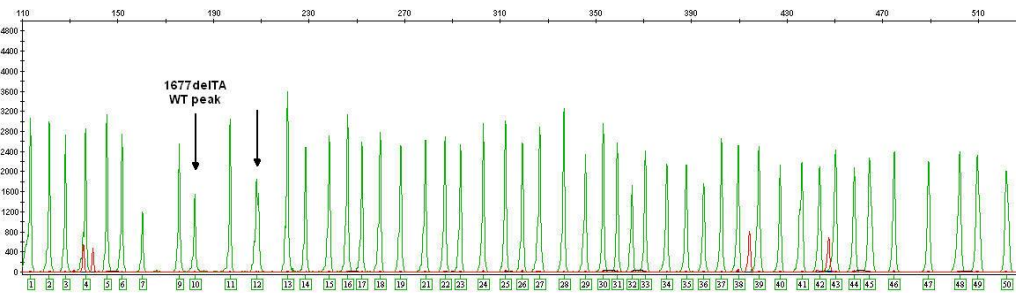
Inserções e deleções

Devido à natureza do desenho do kit CF-EU2v1, a presença de inserções ou deleções para as quais não são incluídos iniciadores nas misturas pode ser detectada através de variações do tamanho esperado para o produto de amplificação na mistura de estirpe selvagem (B). Estas foram tabeladas e estão disponíveis em documento à parte no sítio Web da Gen-Probe: www.gen-probe.com

São apresentados abaixo exemplos do impacto das inserções e das deleções detectadas pelo kit no perfil da mistura B.

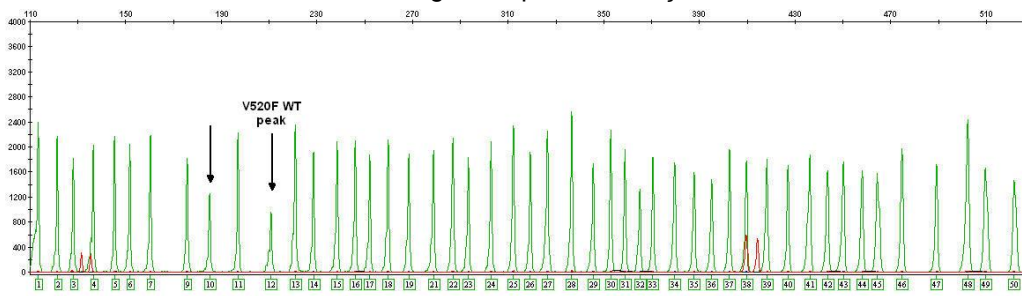
F508del/1677delTA

São observados dois picos com 1 bp de intervalo, na posição 12 (V520F WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para as mutações F508del/1677delTA.



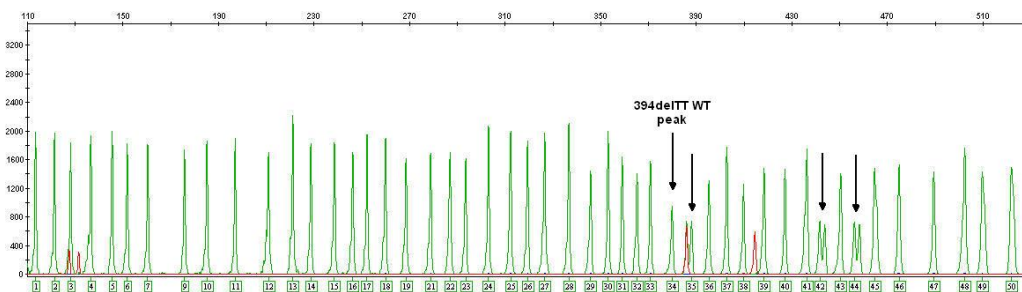
V520F

É observado um pico de estirpe selvagem de altura reduzida, na posição 10 (1677delTA WT), nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação V520F, pois isto impede o iniciador 1677delTA WT de funcionar. Os picos 10 e 12 desaparecem dos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação V520F.



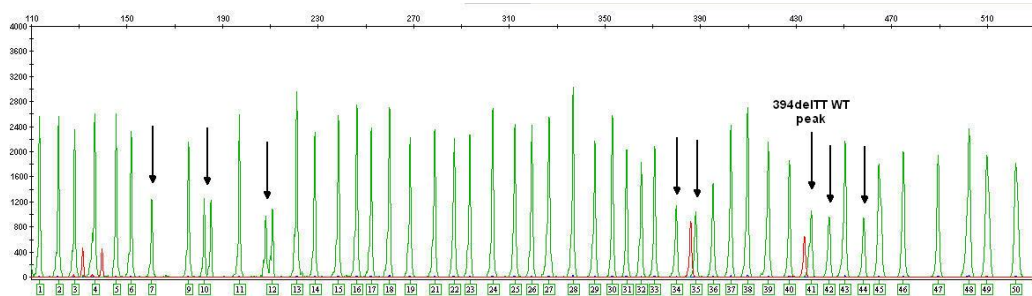
394delTT

São observados dois picos com 2 bp de intervalo, nas posições 35 (G85E WT), 42 (P67L WT) e 44 (E60X WT), nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação 394delTT. O pico 34 desaparece e os picos 35, 42 e 44 terão a altura esperada, mas apresentam um desvio de 2 bp a menos no tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação 394delTT.



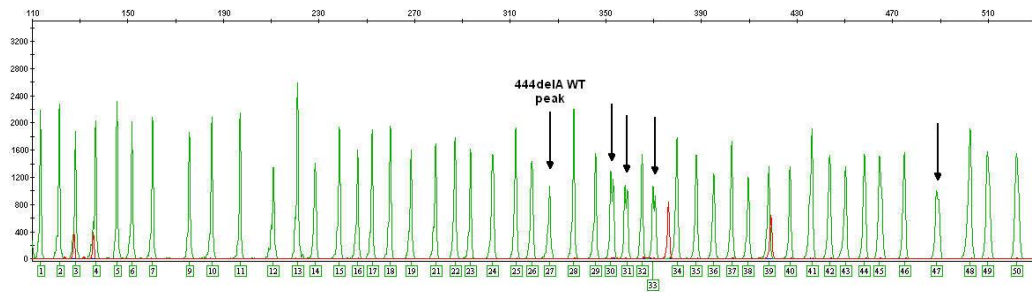
F508del/CFTRdele2,3

São observadas alturas reduzidas dos picos nas posições 34 (394delTT), 35 (G85E WT), 41 (CFTRdele2,3 WT), 42 (P67L WT) e 44 (E60X WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação CFTRdele2,3. Os picos 34, 35, 41, 42 e 44 desaparecem dos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação CFTRdele2,3.



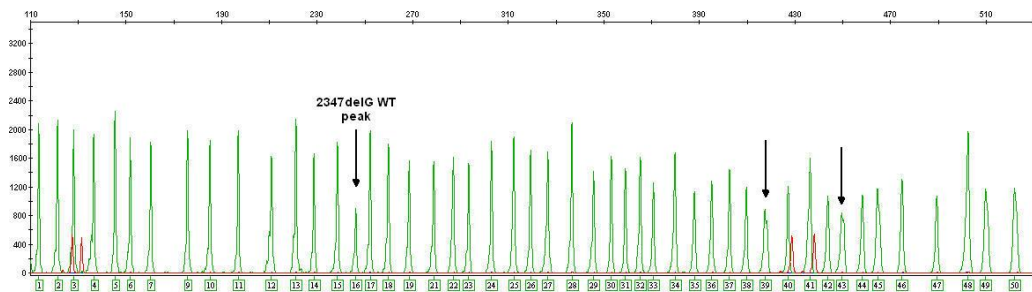
444delA

São observados dois picos com 1 bp de intervalo, nas posições 30 (R117H WT), 31 (R117C WT), 33 (Y122X WT) e 47 (621+1 WT), nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação 444delA. O pico 27 desaparece e os picos 30, 31, 33 e 47 terão a altura esperada, mas estão apresentando um desvio de 1 bp a menos no tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação 444delA.



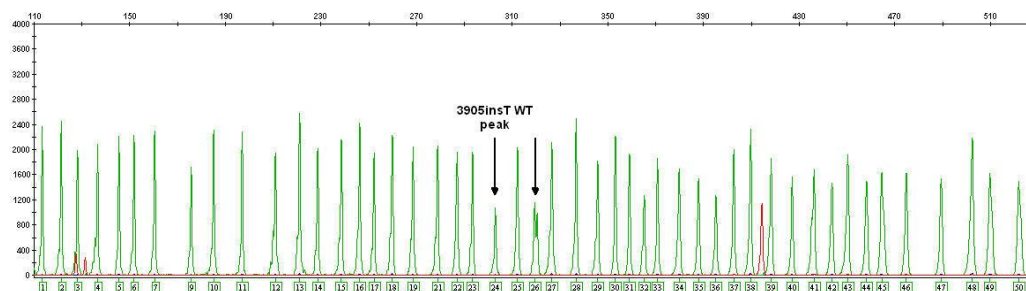
2347delG

São observados dois picos com 1 bp de intervalo, nas posições 39 (2184delA WT) e 43 (2143delT WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para as mutações 2347delG. O pico 16 desaparece e os picos 39 e 43 terão a altura esperada, mas apresentam um desvio de 1 bp a menos no tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação 2347delG.



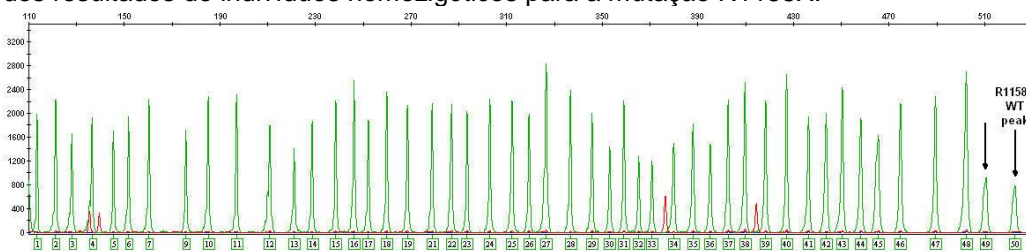
3905insT

São observados dois picos com 1 bp de intervalo, na posição 26 (S1251N WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação 3905insT. O pico 24 desaparece e o pico 26 terá a altura esperada, mas apresentam um desvio de 1 bp a mais do que o tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação 3905insT.



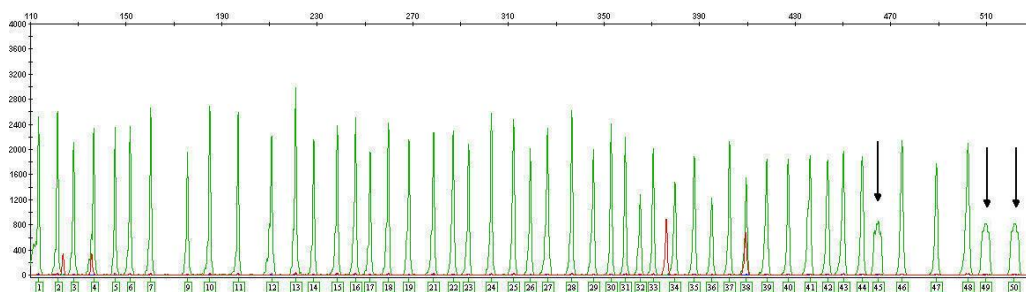
R1158X

É observada uma altura do pico reduzida na posição 49 (R1162X WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação R1158X. O pico 49 desaparece dos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação R1158X.



Polimorfismo rs4148721 (delAT) no intrão 19

São observados dois picos com 2 bp de intervalo, nas posições 45 (3659delC WT), 49 (R1162X WT) e 50 (R1158X WT), nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para o polimorfismo rs4148721 (deleção de AT) no intrão 19. Os picos 45, 49 e 50 terão a altura esperada, mas apresentam um desvio de 2 bp a menos no tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para o polimorfismo rs4148721.



Reactividade cruzada

Durante o desenvolvimento do teste, foram envidados todos os esforços para evitar a interferência no funcionamento do teste da presença de outros polimorfismos e mutações do gene CFTR descritos.

A mutação rara R1283M foi avaliada quanto à possibilidade de reacção cruzada e não foi detectada pelo kit Elucigene CF-EU2v1. Além disso, não foram detectados pelo teste os seguintes polimorfismos: 1655T/G (F508C), 1651A/G.

A avaliação de mutações e polimorfismos conhecidos do gene CFTR revelou os seguintes efeitos nos resultados do kit Elucigene CF-EU2v1:

1. O iniciador mutante G551D da mistura A também detecta a mutação S549RT>G. O software rotula-a como pico 20. Não existe um pico de estirpe selvagem correspondente na mistura B.
2. O iniciador mutante 2184delA da mistura A faz reacção cruzada com a sequência de DNA do mutante 2183AA>G, o que resulta num pico mutante na posição 2184delA.
3. O iniciador mutante 1078delT da mistura A faz reacção cruzada com a sequência de DNA do mutante F316L, o que resulta num pico mutante na posição 1078delT.
4. O iniciador mutante R347P da mistura A faz reacção cruzada com a sequência de DNA do mutante R347H, o que resulta num pico mutante na posição R347P, cuja altura é menor do que a de um pico de R347P verdadeiro.
5. A presença do polimorfismo de F508C (1655T>G) resulta na redução da altura do pico I507del na mistura B de CF-EU2v1.
6. A presença de R117H resulta na redução da altura do pico R117C na mistura B de CF-EU2v1. Numa amostra homocigótica para R117H, o pico R117C está ausente.
7. A presença de G85E resulta na redução da altura do pico 394delTT na mistura B de CF-EU2v1. Numa amostra homocigótica para G85E, o pico 394delTT está ausente.
8. Por vezes, pode observar-se um pico de artefacto muito pequeno na posição I507del nos resultados de amostras heterocigóticas para F508del e, em particular, em amostras homocigóticas para F508del.
9. As mutações que se seguem não foram verificadas quanto a uma eventual reactividade cruzada devido a não estarem disponíveis amostras relevantes, podendo interferir com o funcionamento do teste: R117P, R117L, 1717-2A>G, 621+2T>C, 621+2T>G, R553G, R553Q, R347L, I506T, I506S, I506V e a combinação rara de I507del com o polimorfismo 1651A/G.

Características do desempenho

Realizou-se o teste ocultado de 110 amostras de DNA extraído de sangue total líquido (EDTA) utilizando o Elucigene CF-EU2v1. Cinco amostras falharam após a PCR devido à concentração de DNA ser baixa (inferior a 1,5 ng/ul). Das que deram resultados interpretáveis, 96 foram normais, 5 foram heterocigóticas para F508del, 1 foi heterocigótica para 1717-1, 1 foi heterocigótica para G551D, 1 foi heterocigótica para 621+1, 1 foi heterocigótica para G542X e 1 foi heterocigótica composta para G542X/F508del.

Realizou-se o teste ocultado de 103 amostras de DNA extraído de gotas de sangue seco utilizando o Elucigene CF-EU2v1. Trinta e nove amostras falharam após a PCR devido a má qualidade/concentração de DNA baixa (inferior a 1,5 ng/ul). Das que deram resultados interpretáveis, 55 foram normais, 3 foram heterocigóticas para F508del, 2 foram heterocigóticas para G551D, 1 foi heterocigótica para G542X, 1 foi heterocigótica para W1282X, 1 foi heterocigótica para R553X e 1 foi heterocigótica para D1152H.

Além disso, foram amplificadas em cinco ocasiões distintas 46 amostras de DNA de estado mutacional confirmado. Todas as amostras deram os resultados esperados, sem resultados negativos falsos ou positivos falsos, demonstrando especificidade e sensibilidade clínicas de 100%.

Limitações do procedimento

1. Os resultados obtidos com este ou com qualquer outro teste de diagnóstico devem ser utilizados e interpretados apenas no contexto do quadro clínico global. A Gen-Probe Life Sciences Ltd. não é responsável por quaisquer decisões clínicas que sejam tomadas.
2. A ausência de detecção de mutações por este kit não constitui garantia de que não estejam presentes outras mutações do gene CFTR. É possível a existência de outras mutações não detectadas por este kit.
3. As mutações variam de frequência entre populações diferentes. Os dados de frequência das mutações nas populações estão disponíveis no The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (6).

O utilizador deste kit deve salientar estes aspectos quando reporta os resultados ao médico assistente/responsável pelo aconselhamento genético.

Pode encontrar mais pormenores sobre a interpretação dos dados nos procedimentos do Guia de análise do software do Elucigene CF-EU2v1.

Bibliografia

1. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.* 1998;132:589–95.
2. De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Simard F, Aubin G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet.* 1997;101:208–11
3. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005;353:1443–53
4. Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:816–21
5. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, and Tsui LC. "Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis." *Science* 1989; **245** (4922): 1073-8
6. Cystic Fibrosis Mutation Database, www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app
7. Joshua D. Groman et al. Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Is Pathogenic or Benign. *Am J Hum Genet.* 2004; 74(1): 176–179.
8. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).

Apêndice 1

Guia de resolução de problemas – Elucigene CF-EU2v1

No caso de o teste Elucigene CF-EU2v1 não apresentar um desempenho constante no seu laboratório, queira consultar as sugestões que se encontram nas tabelas abaixo. O controlo de DNA normal fornecido no kit proporciona informações valiosas para o(a) auxiliar no processo de resolução de problemas. Se o controlo de DNA normal não se amplificar de forma constante, o processo de resolução de problemas deve concentrar-se nas condições da PCR e da electroforese. Se o controlo de DNA normal não for afectado, é mais provável que a causa do problema esteja nas amostras testadas ou no método de preparação do DNA.

Se necessitar de mais conselhos, queira contactar o grupo de assistência técnica, que terá todo o gosto em contribuir para a resolução dos problemas.

1. Sem picos de diagnóstico ou STR

| | Causa possível | Ação sugerida |
|------------|---|---|
| DNA | Modelo de DNA insuficiente | Reinjecte a amostra no analisador genético durante um período de tempo mais prolongado, por exemplo, 24 segundos. Volte a extrair a amostra. |
| PCR | Protocolo incorrecto, p. ex. mistura principal para PCR não combinada com a mistura de iniciador. Programa utilizado incorrecto. | Reveja o protocolo consultando as instruções de utilização. Repita as análises seguindo os métodos descritos nas Instruções de utilização. |

2. Picos de diagnóstico ou STR fracos

| | Causa possível | Ação sugerida |
|------------|--|--|
| DNA | DNA de má qualidade ou inibidor da PCR presente. Baixa quantidade de modelo de DNA. | Verifique o método de preparação, as soluções ou o armazenamento. Dilua o DNA extraído de 1:5 e volte a analisar. Volte a preparar o DNA utilizando um método recomendado e reanalise. Reduza o limiar de amplitude do pico para 50 e reanalise. Reinjecte a amostra no analisador genético durante um período de tempo mais prolongado, por exemplo, 24 segundos. Volte a extrair a amostra. |
| PCR | Programa utilizado incorrecto. Protocolo incorrecto, p. ex. mistura principal para PCR não combinada com a mistura de iniciador nas proporções correctas. | Verifique o programa do termociclador e o calendário de calibração/assistência e reanalise. Reveja o protocolo consultando as instruções de utilização. Repita as análises seguindo os métodos descritos nas Instruções de utilização. |

3. Picos demasiado elevados

| | Causa possível | Acção sugerida |
|------------|--------------------------------|---|
| DNA | Excesso de modelo de DNA. | Aumente o limiar de amplitude do pico e reanalise. Reinjecte a amostra no analisador genético durante menos tempo, por exemplo, 3 segundos. Dilua o DNA e volte a amplificar. |
| PCR | Programa utilizado incorrecto. | Verifique o programa do termociclador e o calendário de calibração/assistência e reanalise. |