

## Influenza A virus Qual PCR Box 1.0

Dispositivo para utilização *in vitro*

### Manual de Instruções



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO  
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

geneBOX - R&D Diagnostic Tests,  
biocant, centro de inovação em biotecnologia  
núcleo 4, lote 3  
3060-197 Cantanhede, Portugal  
tel: + 351 231410946  
fax: +351 231 410947  
e-mail: [info@genebox.com](mailto:info@genebox.com)



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO  
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

Versão1.1; Abril de 2011

## Índice

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| Apresentação.....                                 | 4  |
| Alterações e Melhoramento do produto.....         | 4  |
| Controlo da Qualidade .....                       | 5  |
| Sensibilidade e Especificidade.....               | 5  |
| Componentes do Influenza A virus Box 1.0 Kit..... | 6  |
| Pré-análise.....                                  | 7  |
| Colheita.....                                     | 7  |
| Armazenamento.....                                | 7  |
| Transporte.....                                   | 8  |
| Extracção de RNA.....                             | 9  |
| Reagentes.....                                    | 9  |
| Amplificação por PCR .....                        | 9  |
| Parâmetros do programa de PCR.....                | 10 |
| Protocolo de electroforese em gel de agarose..... | 11 |
| Preparação do gel a 4%.....                       | 11 |
| Electroforese.....                                | 11 |
| Tabela de interpretação dos Resultados .....      | 12 |
| Guia de resolução de problemas .....              | 13 |
| Avisos e precauções.....                          | 15 |
| Guia técnico.....                                 | 17 |
| Garantia.....                                     | 18 |
| Aviso de Garantia.....                            | 18 |
| Declaração de Conformidade .....                  | 19 |

## Referências

1. Alexander Nagy, Veronika Vostinakova, Zuzana Pirchanova, Lenka Cernikova, Zuzana Dirbakova, Miroslav Mojzis, Helena Jirincova, Martina Havlickova, Adam Dan, Krisztina Ursu, Stefan Vilcek, Jitka Hornickova. 2010. Development and evaluation of a one-step real-time RT-PCR assay for universal detection of influenza A viruses from avian and mammal species. Arch Virol. 155:665–673.
2. Bao Y, Bolotov P, Dernovoy D, Kiryutin B, Zaslavsky L, Tatusova T, Ostell J, Lipman D (2008) The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information. J Virol 82:596–601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>
3. Fouchier RAM, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus DME (2000) Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. J Clin Microbiol 38:4096– 4101
4. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR (2001) Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch Virol 146:2275–2289
5. <http://www.cdc.gov/>
6. <http://www.thepigsite.com/diseaseinfo/118/swine-influenza-virus-si-flu>
7. <http://www.thepoultrysite.com/bird-flu/bird-flu-news.php>

**Folha de Dados de Segurança (3/3)**  
Material Safety Data Sheet (MSDS)

**Equipamento especial de combate ao incêndio:** quando são libertadas grandes quantidades de substância trabalhe apenas com protecção adequada para olhos e pele.

**11. Medidas a tomar no caso de derrame acidental**

**Precauções pessoais:** evite o contacto directo com a substância.

**Limpeza:** limpe normalmente a área afectada, não são necessários cuidados adicionais.

**Protecção da pele:** use uma bata de laboratório.

**12. Informação ecológica**

Não existem dados disponíveis.

**13. Informação sobre a eliminação**

Elimine o material de acordo com toda a regulamentação aplicável (Grupo IV – resíduos hospitalares específicos).

**14. Informação sobre o transporte**

No transporte dos Kits devem estar a seguradas as temperaturas, não devendo ultrapassar os 15°C. A duração do transporte não deve ser superior a 3 dias, de modo a garantir que todos os componentes do Kit cheguem em perfeitas condições aos seus destinatários.

**15. Contactos Úteis**

Número Nacional de Emergência: 112

Centro de Informação Anti-Venenos: 808 250 143

**16. Outras informações**

As informações acima disponíveis são baseadas no nível de conhecimento actual, devendo ser utilizado apenas como guia. A geneBOX - R&D Diagnostic Tests não se responsabiliza por qualquer dano causado pela manipulação inapropriada ou pelo contacto com os referidos produtos.

**Para mais esclarecimentos, por favor contactem com o  
apoio técnico para o +351 231 410 946**

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| Folha de dados de segurança..... | 20 |
| Referências.....                 | 23 |

## Apresentação

O vírus Influenza do tipo A é um género pertencente à família *Orthomyxoviridae* dos vírus e é o agente etiológico da gripe influenza em aves e em alguns mamíferos, nomeadamente, suínos. Ocasionalmente, os vírus podem ser transmitidos de aves selvagens para animais domésticos, podendo originar surtos de gripe influenza e pandemias em humanos.

Os vírus influenza A são classificados de acordo com o tipo de hemaglutinina (H1 a H16) e o tipo de neuraminidase (N1 e N9), sendo que, ao nível estrutural, os vírus influenza do tipo A são todos semelhantes. O genoma é formado por cerca de 13588 bases e organizado em oito cadeias de RNA simples de sentido negativo que codificam onze proteínas.

**Influenza A virus Qual PCR Box 1.0** é um teste para diagnóstico molecular da infecção por Influenza A virus, com maior sensibilidade, especificidade e rapidez do que os métodos tradicionais por cultura.

**Influenza A virus Qual PCR Box 1.0** detecta o gene segmento 7 de Influenza A virus.

## Alterações e melhoramento do Produto

Este produto pode ser melhorado de modo a incluir novas variantes que venham a ser descritas, bem como para aumentar o seu rendimento.

As alterações, adições ou modificações de INFLUA Mix, Controlo Interno, Controlo Positivo ou Controlo Negativo, em relação ao lote anterior estão detalhadas na tabela abaixo:

| Tubo | Modificação | Motivo |
|------|-------------|--------|
| N/A  |             |        |

## Folha de Dados de Segurança (2/3) Material Safety Data Sheet (MSDS)

### 4. Informação Toxicológica

| Químico  | Toxicidade                                                                                         |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Glicerol | LD50= oral 4090 mg/kg (ratinho)<br>LD50= oral 12600 mg/kg (rato)<br>LD50= oral 1480 mg/kg (humano) |

### 5. Estabilidade e reactividade

**Condições a evitar:** Calor e humidade.  
**Incompatibilidades:** Bases e agentes oxidantes fortes.

### 6. Protecção pessoal.

**Protecção das mãos:** use luvas apropriadas, resistentes a químicos.  
**Protecção dos olhos:** recomenda-se o uso de óculos de protecção química.

### 7. Manipulação e armazenamento

**Manipulação:** evite o contacto directo com a substância.  
**Armazenamento:** armazene à temperatura aconselhada, proteja do contacto com a luz.  
**Danificação da embalagem protectora:** rejeitar o constituinte contido na embalagem.

### 8. Perigos

**Os componentes da mistura de reacção** podem ser perigosos se inalados, ingeridos ou absorvidos pela pele. Este material pode causar irritação da pele, dos olhos e do tracto respiratório. A ingestão de grandes quantidades desta mistura pode causar dores de estômago, vômitos ou diarreia.

### 9. Medidas de Primeiros Socorros

No caso de **contacto com os olhos**, deve lavar imediatamente os olhos com água abundante por cerca de 15 minutos. Deve consultar o seu médico.  
No caso de **contacto com a pele**, deve lavar imediatamente a zona afectada com água corrente e sabão. Lave a roupa contaminada antes da sua utilização.  
No caso de **ingestão**, lave a boca com água abundante. Deve contactar o seu médico se necessário.  
No caso de **inalação**, mudar a vítima para um local arejado. Se encontrar inanimado aplique respiração artificial. Se apresentar dificuldades respiratórias aplique oxigénio. Deve consultar o seu médico.

### 10. Medidas a tomar em caso de incêndio

**Meios de extinção:** Água, dióxido de carbono, pó químico seco ou espuma apropriada.  
**Meios de extinção não aconselhados:** não existem restrições conhecidas.  
**Perigos específicos de exposição:** em caso de incêndio podem emitir fumos tóxicos de dióxido e monóxido de carbono, nitrogénio, fósforo, cloreto de hidrogénio, e gás hidrogénio.

### geneBOX - R&D Diagnostic Tests™ PCR Kits

#### Produtos PCR da geneBOX™

Esta folha de dados de segurança é aplicável a todos os produtos de PCR da geneBOX™.

#### 1. Produtos Químicos e Identificação da Companhia

Data de realização: Dezembro de 2010  
 Grupo do produto: Produtos de PCR da geneBOX™  
 Manufaturação: geneBOX - R&D Diagnostic Tests, biocant, centro de inovação em biotecnologia núcleo 4, lote 3  
 3060-197 Cantanhede, Portugal  
 tel: + 351 231410 946  
 fax: +351 231 410 947  
 e-mail: [info@genebox.com](mailto:info@genebox.com)

#### 2. Composição e Informação sobre os reagentes

| Componente         | Químico                                                                                                    | Nome vulgar              | Nº de lote |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------|
| Mistura de primers | Acido Desoxiribonucleico                                                                                   | Oligonucleótido          |            |
| Mistura de reacção | Desoxiribonucleótidos<br>Tampão<br>Cloreto de Magnésio<br>Vermelho de Cresol<br>Glicerol<br>DNA polimerase | Nucleótidos<br><br>MgCl2 |            |
| Controlo interno   | Acido Desoxiribonucleico                                                                                   | Oligonucleótido          |            |
| Controlo positivo  | Acido Desoxiribonucleico                                                                                   | DNA                      |            |
| Controlo negativo  | H <sub>2</sub> O                                                                                           | Água bidestilada estéril |            |

#### 3. Propriedades físico-químicas:

| Componente         | Aspecto | Cor           | Odor   |
|--------------------|---------|---------------|--------|
| Mistura de primers | líquido | incolor       | nenhum |
| Mistura de reacção | líquido | vermelho/rosa | nenhum |
| Controlo Interno   | líquido | incolor       | nenhum |
| Controlo Positivo  | líquido | incolor       | nenhum |
| Controlo Negativo  | líquido | incolor       | nenhum |

#### Controlo de Qualidade

O kit Influenza A virus Qual PCR Box 1.0 foi testado com plasmídeos amplificados com a sequência alvo, DNA e cDNA de outras espécies de vírus obtendo amostras positivas e negativas. A Genebox garante a qualidade e a fiabilidade do seu kit Influenza A virus Qual PCR Box 1.0.

#### Especificidade

O kit Influenza A virus Qual PCR Box 1.0 é específico para a detecção do gene segmento 7 do genoma de *Influenza A virus* em amostras biológicas.

A sua especificidade foi comprovada com plasmídeos amplificados com a sequência alvo de *Influenza A virus* e outras espécies de vírus obtendo amostras positivas e negativas.

A especificidade do kit Influenza A virus Qual PCR Box 1.0 é conferida por INFLUA mix, que apresenta 100% de homologia com todas as sequências de todas as espécies de *Influenza A virus* registadas em bases de dados.

#### Sensibilidade

A sensibilidade do kit Influenza A virus Qual PCR Box 1.0 foi testada e a Genebox garante a detecção de níveis mínimos do gene segmento 7 do genoma de *Influenza A virus* até 25x10<sup>-5</sup> ng de cDNA.

### Componentes do Influenza A virus Qual PCR Box 1.0 Kit

- **Mistura de reacção INFLUA**  
1 tubo **INFLUA mix** – 1 ml (conservar de -30 a -15°C)
- **Controlo Interno CI**  
1 tubo **CI** – 100 µl (conservar de -30 a -15 °C)
- **Controlo Positivo CP**  
1 tubo **CP** - 50 µl (conservar de -30 a -15 °C)
- **Controlo Negativo CN**  
1 tubo **CN** - 50 µl (conservar de -30 a -15°C)
- **Manual de instruções**  
1 Manual de Instruções

### Componentes da PCR Master Mix

#### Nucleótidos:

concentração final de cada dNTP é 1000 µM

#### Tampão da PCR:

concentrações finais são 3,3x NH<sub>4</sub>, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,4 u/µl Taq DNA polimerase, pH 8.3.

#### Glicerol:

concentração final é 16,6%

#### Vermelho de cresol:

concentração final é de 300µg/ml

### Declaração de Conformidade

**Nome do Produto:** Influenza A virus Qual PCR Box 1.0

**Numero do Produto:** GB.0210

**Utilização:** Detecção de *Influenza A virus*.

**Produção:** geneBOX - R&D Diagnostic Tests,  
biocant – centro de inovação em biotecnologia  
núcleo 4, lote 3  
3060-197 cantanhede, portugal

Nós, geneBOX - investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico, indubitavelmente declaramos que este produto, ao qual se relaciona esta declaração de conformidade, está em conformidade com os seguintes documentos normativos, ISO 9001:2008 e ISO 13485:2004. Seguindo ainda, as indicações da Directiva Europeia 98/79/CE sobre dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*, conformidade de acordo com o Anexo IV, transposto para as leis nacionais dos estados membros da União Europeia.

A ficha e os documentos técnicos deste produto são mantidos na geneBOX, biocant, centro de inovação em biotecnologia, 3060-197 Cantanhede, Portugal.

Sandra Balseiro  
Directora Técnica

## Garantia

geneBOX – investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico garante que os primers presentes no Influenza A vírus Qual PCR Box apresentam as especificidades dadas nas folhas e tabelas de interpretação de resultados do produto.

### 1. INFLUA mix, CI, CP e CN

Armazenamento a -20°C, INFLUA mix, CI, CP e CN permanecem estáveis durante 12 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).

Armazenamento a 4°C, de INFLUA mix, CI, CP e CN permanecem estáveis durante 15 dias a partir da data de recepção.

À temperatura ambiente, INFLUA mix, CI, CP e CN permanecem estáveis durante 3 dias a partir da data de recepção.

INFLUA mix, CI, CP e CN nunca devem ser deixados ou armazenados com a tampa aberta.

### 2. RNA e cDNA

As amostras de RNA e cDNA armazenadas em água livre de RNases permanecem estáveis durante, 2 anos (a -20°C ou -80°C).

## Aviso de garantia

geneBOX –investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico responsabiliza-se, perante os seus clientes, pelos defeitos no material e componentes dos seus produtos aplicados em condições normais. Os produtos da empresa que apresentam esta garantia devem ser substituídos, sem encargos para o cliente.

Esta garantia aplica-se só para produtos que sejam manipulados e armazenados de acordo com as especificações e recomendações de utilização.

As reclamações devem ser enviadas, por escrito, directamente para a geneBOX e devem ser acompanhadas por uma cópia da guia de transporte ou factura do produto.

Este produto não pode ser reformulado, reembalado ou revendido em nenhuma forma sem o expreso consentimento da geneBOX - investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico.

## Protocolo de amplificação por PCR (1/4)

### Pré-análise

#### 1- Colheita de amostras

Para garantir um teste de alta qualidade das amostras devem ser colhidas nas seguintes condições:

##### A - Plasma e soro<sup>+</sup>

A amostra de sangue deve ser colhida para Tubos de colheita 2-10ml *BD Vacutainer® Blood EDTA* ou Tubos de colheita *Vacutainer® BD Blood Serum* (vidro ou plástico). Alternativamente, podem ser usados tubos de colheita com marcação CE de outras marcas.

**NÃO UTILIZAR AMOSTRAS HEPARINIZADO COM ESTE MÉTODO.**

##### B – Zaragatoas<sup>+</sup>

A amostra deve ser colhida com uma zaragatoa *Dacron®* de plástico. Alternativamente, podem ser usadas zaragatoas de plástico com marcação CE de outras marcas. Não use zaragatoas de alumínio ou madeira. Após a colheita as amostras podem ser transportados em meio de cultura 1-2 ml, como nos seguintes exemplos:

- STM AMPLICOR (meio de transporte da amostra, Roche, Inc.)
- Kit para colheita de zaragatoas (Digene Corporation)
- Médio de PBS a 10% (*Home made*)

<sup>+</sup> *Precaução: Todas as amostras têm de ser tratadas como material potencialmente infeccioso.*

NOTA: Os Nossos Kits também podem ser usado com amostras de fezes e urina (desde que se utilize um kit de extracção adequado)

#### 2- Armazenamento da Amostra

A sensibilidade do teste pode ser reduzida com o processo repetitivo de congelação/descongelação ou com longos períodos de armazenamento.

## Protocolo de amplificação por PCR (2/4)

### A - Plasma e soro

Se o plasma ou soro for testado dentro de 24 horas, após a sua colheita, as amostras podem ser armazenadas à temperatura ambiente (15-25°C). Se o teste é realizado dentro de uma semana, as amostras devem ser armazenadas no frio (2-8 °C) ou por períodos mais longos entre -15/-30 ° C.

### B – Zaragatoas

Se a amostra for testada dentro de 24 horas, após a sua colheita, as zaragatoas podem ser armazenadas no frio (2-8°C). Se o teste é realizado dentro de uma semana, ou por períodos mais longos, as amostras devem ser armazenadas entre -15/-30 ° C.

### 3- Transporte de amostras

A sensibilidade do teste pode ser comprometida se as amostras forem expostas a altas temperaturas por um longo período de tempo.

### A - Plasma e soro

O sangue colhido deve ser armazenado a frio (2-8°C) até ao envio e deve ser transportado em conformidade com as instruções nacionais para o transporte amostras Biológicas/patogénicos. Para garantir uma boa qualidade da amostra, estas devem ser transportadas dentro de 24h.

### B – Zaragatoas

A amostra colhida deve ser armazenada a frio (2-8°C) até ao envio e deve ser transportada em conformidade com as instruções nacionais para o transporte amostras Biológicas/patogénicos. Para garantir uma boa qualidade da amostra, estas devem ser transportadas dentro de 24h.

## Guia Técnico

### 1. Pureza e Concentração do RNA

Para obter bons resultados com o Influenza A virus Qual PCR Box 1.0 recomenda-se o uso de kits de extração de RNA e de transcrição reversa que apresentem marcação CE, de modo a obter um RNA extra puro e uma transcrição reversa com bom rendimento e que garanta a qualidade do cDNA obtido.

### 2. DNA Polimerase

O Influenza A virus Qual PCR Box 1.0 foi intensivamente testado utilizando a DNA polimerase da Reagente 5 (Reagente 5, Lisboa, Portugal).

### 3. INFLUA mix

Para uma boa performance detecção de *Influenza A virus* com o Influenza A virus Qual PCR Box 1.0 é obrigatória a utilização da INFLUA Mix fornecida com o Kit.

### 4. Procedimentos de amplificação

Para uma correcta utilização do kit aconselha-se a seguir o programa de PCR apresentado neste Manual de Instruções.

### 5. Termociclador

Recomenda-se utilização de qualquer Termociclador que apresente as seguintes características:

- "heating rate" superior a 2.5°C/sec; "cooling rate" superior a 1.5°C/sec; gama de temperaturas 4-100°C; uniformidade de temperaturas ±0.5°C; "heated lid" superior a 100°C.

### 6. Validade

Como especificado na embalagem

**Se os problemas persistirem, por favor contactem com o apoio técnico para o  
+351 231 410 946**



## Avisos e precauções (2/2)

- Os componentes dos kits são resistentes às temperaturas de armazenamento indicadas. O armazenamento dos kits a temperaturas não recomendadas pode levar a rupturas no material e contaminação dos reagentes dos kits.
- Os materiais plásticos fornecidos neste kit são resistentes à gama de temperaturas de utilização e armazenamento recomendado. A sua utilização em gamas distintas de temperaturas pode causar rupturas impossibilitando a utilização normal do kit.
- Verifique a concentração e qualidade de todas as amostras de RNA e cDNA antes de utilizar este kit.

### Instruções de gerais de segurança no laboratório:

- Não coma, beba ou fume dentro do laboratório.
- Utilize sempre luvas descartáveis e mude-as com frequência.
- Utilize batas limpas e proteja os olhos (sempre que se justifique).
- Lave as mãos antes e depois de qualquer manipulação de amostras ou reagentes.
- Lave a área de trabalho antes e depois de qualquer manipulação.
- Não pipete com a boca.

## Protocolo de amplificação por PCR (3/4)

### Extracção de RNA

A sensibilidade do teste pode ser reduzido se você usar um método de isolamento de RNA ineficiente. A detecção destes tipo de vírus requer amostras de RNA altamente puras e integras. As quantidade e qualidade das amostras dependem do protocolo de isolamento de RNA usado. Recomenda-se a kits de isolamento seguintes, tanto para plasma/soro como para zaragatoas:

- QIAamp RNesy Mini Kit (from QIAGEN)
- QIAamp RNA Viral Mini Kit (from QIAGEN)

Alternativamente, podem ser usados outros kits com a marcação CE para extracção de RNA, que garantam bons níveis de concentração e integridade da amostra.

### Síntese de cDNA

Para a detecção de *Influenza A virus* por PCR é necessário cDNA. Recomenda-se que a transcrição reversa para cDNA seja realizada utilizando kits com marcação CE, que garantam a qualidade dos produtos finais obtidos.

### Reagentes

- Amostra de cDNA
- Mistura de reacção **INFLUA mix**
- Controlo interno **CI**
- Controlo positivo **CP\***
- Controlo negativo **CN**
- Água bi-destilada estéril (não fornecida)

\* Este componente apresenta alto potencial contaminante, dado conter cDNA do vírus Influenza A, recomenda-se o máximo cuidado no seu manuseamento.

## Protocolo de amplificação por PCR (4/4)

### Amplificação por PCR

1. Agite brevemente todos os tubos do kit e os tubos de DNA
2. Para cada detecção pipete de acordo com a tabela I.

Tabela I

| Componente                      | 1 Reacção |
|---------------------------------|-----------|
| <b>Tubo INFLUA</b> mix          | 8 µl      |
| <b>Tubo Controlo Interno CI</b> | 1 µl      |
| DNA de amostra                  | 1 µl      |
| <b>Volume final</b>             | 10 µl     |

NOTA: Por cada utilização do kit deve correr, pelo menos, uma reacção CP e CN.

3. Para o controlo positivo proceder como em (2), substituindo o DNA de amostra por 1 µl de **Tubo Controlo Positivo CP**.
4. Para o controlo negativo proceder como em (2), substituindo o Controlo Interno por 1 µl de água bidestilada estéril e o DNA de amostra por 1 µl de **Tubo controlo negativo CN**.
5. Coloque os componentes da reacção no termociclador e corra o seguinte programa de PCR.

### Programa PCR

| Passo                                       | Temperatura | Tempo    | Ciclos |
|---------------------------------------------|-------------|----------|--------|
| Desnaturação                                | 95 °C       | 1 min    | 1      |
| Desnaturação<br>Emparelhamento<br>Extensão* | 95 °C       | 10 seg   | 40     |
|                                             | 60 °C       | 45 seg   |        |
|                                             | 72 °C       | 45 seg   |        |
| Fim                                         | 4 °C        | Infinito | 1      |

6. Detecte os produtos do PCR com uma electroforese em gel de agarose a 4%. Use a Tabela de interpretação de resultados para interpretar os resultados.

## Avisos e precauções (1/2)

A amplificação por PCR permite-nos obter milhões de cópias de DNA a partir de uma pequena quantidade de amostra. Infelizmente isto também é verdade para o DNA contaminante, que pode comprometer performance da nossa reacção. Consequentemente, práticas laboratoriais específicas podem evitar a presença de amplificações inespecíficas. Em baixo encontram-se descritas as recomendações da Genebox:

- Separe fisicamente as áreas de pré-PCR e de pós-PCR.
- O fluxo Laboratorial deve ser sempre unidireccional da área pré-PCR para a área pós-PCR.
- Deve sempre utilizar-se equipamentos específicos para cada area de trabalho (preparação de amostras; pré-amplificação amplificação e pós-amplificação).
- Todos os equipamentos utilizados na área de pós-PCR não devem sair desta zona.
- Utilize micropipetas, luvas e batas específicas para cada área.
- Utilize preferencialmente luvas sem talco (uma vez que o talco pode inibir a reacção de PCR).
- Utilize pontas de filtro de forma a minimizar contaminações cruzadas.
- Verifique periodicamente as micropipetas de forma a assegurar a variação de pipetagem inferior a 5%.
- Utilize micropipetas adaptadas a cada volume de pipetagem.
- Verifique periodicamente os termocicladores, de forma a assegurar a variação de temperaturas inferiores a 1%.
- Abra e feche os reagentes com cuidado. Depois de utilizar armazene os restantes componentes do kit às temperaturas recomendadas devidamente fechados.
- Não utilize o kit com a validade expirada.

| PROBLEMAS                                                                 | POSSIVEIS CAUSAS                  | SUGESTÕES                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Falsos negativos de uma banda específica com o controlo interno normal    | Degradação da amostra de RNA      | Reextraia a amostra de RNA de material fresco                                                                                   |
|                                                                           | Degradação da amostra de cDNA     | <p>Repita a reacção de transcrição reversa com um RNA de boa qualidade</p> <p>Repita a reacção com um cDNA de boa qualidade</p> |
| Esfregaço de bandas                                                       | Degradação da amostra de RNA      | Reextraia a amostra de RNA de material fresco                                                                                   |
|                                                                           | Degradação do cDNA da amostra     | Repita a reacção com um cDNA de boa qualidade                                                                                   |
|                                                                           | Amostra de cDNA muito concentrada | Verifique a qualidade e concentração do cDNA                                                                                    |
|                                                                           |                                   | Dissolva o cDNA em $dH_2O$ de forma a obter a concentração exacta                                                               |
|                                                                           |                                   | Repita a reacção com um cDNA de boa qualidade                                                                                   |
| Problemas com tampão de electroforese: Fora de prazo ou composição errada | Use um tampão recomendado novo    |                                                                                                                                 |

### Protocolo de electroforese em gel de agarose

#### Preparação do gel de agarose a 4%

1. Dissolver **8 gramas** de pó **agarose** em **200 ml** de tampão **TAE 1X**.
2. Dissolver completamente a agarose aquecendo-a no microondas.
3. Arrefeça o gel até, aproximadamente, 50°C.
4. Adicione pelo menos **20 µl de brometo de etídio<sup>++</sup>** (10 mg/ml) **ou de Sybr Safe** (10000x concentrado à agarose). Agite até estar completamente incorporado.
5. Numa superfície nivelada, monte a placa do gel com 96 poços.
6. Verta uma camada de gel com cerca de **5mm**.
7. Deixe o gel arrefecer.

<sup>++</sup> Atenção este reagente é um forte agente mutagénico (leia atentamente a MSDS do produto).

#### Electroforese

1. Submirja o gel na tina de electroforese com tampão TAE 1X.
2. Remova os pentes com cuidado do gel.
3. Adicione **10 µl do produto de PCR** em cada poço.
4. Ligue a tina de electroforese à corrente com uma voltagem média (**115V**).
5. Deixe a electroforese correr por cerca de 20 minutos, ou até o corante estar a 2/3 da linha.
6. Ponha o gel no transluminador.
7. Fotografe o gel e identifique-o.
8. Use a **Tabela de interpretação de resultados** para interpretar os resultados.

### Tabela de Interpretação de resultados

**Tabela I** – Interpretação de análises válidas

| Poço    | Influenza A virus *188pb | Controlo Interno **101pb | Interpretação              | Validação |
|---------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------|
| Amostra | +                        | +                        | Influenza A virus Positivo | Validado  |
| Amostra | -                        | +                        | Influenza A virus Negativo | Validado  |
| CP      | +                        | +                        | Controlo positivo          | Validado  |
| CN      | -                        | -                        | Controlo Negativo          | Validado  |

\* Tamanho da banda específica; \*\* Tamanho da banda de Controlo Interno

**Tabela II** - Interpretação de análises não válidas

| Poço    | Influenza A virus | Controlo Interno | Interpretação                 | Validação       |
|---------|-------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|
| Amostra | +                 | -                | Influenza A virus Positivo(?) | Repetir reacção |
| Amostra | -                 | -                | Influenza A virus negativo(?) | Repetir reacção |
| CP      | +                 | -                | Controlo positivo inválido    | Repetir reacção |
| CP      | -                 | -                | Controlo positivo inválido    | Repetir reacção |
| CP      | -                 | +                | Controlo positivo inválido    | Repetir reacção |
| CN      | -                 | +                | Controlo negativo inválido    | Repetir reacção |
| CN      | +                 | +                | Controlo negativo inválido    | Repetir reacção |
| CN      | +                 | -                | Controlo negativo inválido    | Repetir reacção |

### Guia de resolução de problemas

| PROBLEMAS                                        | POSSIVEIS CAUSAS                                              | SUGESTÕES                                                                                          |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bandas controlo e específicas fracas             | Concentração da amostra de RNA baixa                          | Verifique a qualidade e concentração do RNA                                                        |
|                                                  |                                                               | Reextraia a amostra de RNA ou tente não adicionar água à mistura de reacção                        |
|                                                  |                                                               | Repita a reacção com um RNA de boa qualidade                                                       |
|                                                  | Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de RNA  | Repurifique a amostra de RNA                                                                       |
|                                                  |                                                               | Repita a reacção com um RNA de boa qualidade                                                       |
|                                                  | Concentração de cDNA baixa                                    | Repita a reacção de transcrição reversa                                                            |
| Os controlos internos falharam em diversos poços | Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de cDNA | Repita a reacção com um cDNA de boa qualidade                                                      |
|                                                  | Produtos de amplificação secos                                | Verifique a selagem das placas                                                                     |
|                                                  |                                                               | Repita a reacção utilizando um adaptador de silicone para placas de 96 e/ou adicione óleo mineral. |