



Istruzioni d'uso per i Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits Versione 4. giugno 2011.

1. Finalità d'uso

I Biofortuna HLA SSPGo Kits sono kit qualitativi per la determinazione, mediante l'analisi del DNA, degli alleli HLA nei kit ad 'alta risoluzione' o per l'amplificazione gruppo-specifica degli alleli nei kit a risoluzione 'livello medio'. La definizione comune di livello di risoluzione media indica la condizione in cui la maggior parte dei risultati sono chiaramente definiti nell'ambito del livello a due cifre; per es. DQB1*02, DQB1*05, ecc. L'alta risoluzione viene generalmente definita come la condizione in cui la maggioranza degli alleli sono definiti al livello di quattro cifre quali DQB1*02:01, DQB1*05:01, ecc. Questo è un prodotto diagnostico *in vitro* previsto per l'utilizzo esclusivamente da parte di personale qualificato.

2. Introduzione

Le molecole HLA hanno una funzione fondamentale nell'immunità e nel riconoscimento tra self e non-self, di conseguenza la genotipizzazione e la tipizzazione HLA sono obbligatorie prima della maggior parte dei tipi di trapianto. Poiché gli antigeni HLA circoscrivono la specificità delle risposte immunitarie mediate dai linfociti T, la genotipizzazione HLA è un utile strumento investigativo in qualsiasi disfunzione immunitaria o in qualsiasi risposta immunitaria ad agenti patogeni, vaccini o cure mediche. La genotipizzazione HLA può inoltre essere usata come ausilio alla diagnosi, nel caso in cui determinati alleli HLA siano stati associati in modo significativo agli stadi della malattia.

La maggior parte dei geni HLA sono altamente polimorfi e per una determinazione accurata degli antigeni HLA è generalmente richiesta una genotipizzazione del DNA. La genotipizzazione tramite PCR con primer sequenza-specifici (Sequence-Specific Primers, SSP)¹ è un metodo rapido di genotipizzazione HLA, particolarmente adatto a situazioni in cui è richiesto il livello di risoluzione media. Tutti i kit Biofortuna SSP contengono reazioni completamente liofilizzate, inclusa la polimerasi, in modo che l'operatore deve dispensare solamente il DNA prima di avviare la reazione di PCR.

I kit vengono continuamente aggiornati in modo da riflettere le comunicazioni di allineamento IMGT HLA. Gli aggiornamenti dei kit sono disponibili sul sito www.biofortuna.com.

3. Descrizione del test

La PCR SSP si basa sul principio per cui solamente i primer che coincidono completamente all'estremità 3' di una sequenza target vengono amplificati. Primer che non coincidono non danno luogo a prodotti di amplificazione positivi.² In ogni miscela di reazione PCR è inclusa una coppia interna di primer di controllo, che amplifica un regione conservata di un gene costitutivo; la coppia interna di primer di controllo è un indicatore dell'integrità della reazione di PCR. La genotipizzazione SSP generalmente usa reazioni multiple, che analizzate insieme, indicano il genotipo. La

visualizzazione dei prodotti amplificati può essere ottenuta utilizzando i sistemi di elettroforesi su gel di agarosio, che separa i frammenti di DNA in base alla loro dimensione.

4. Contenuto dei kit

- 10-40x piastre o strisce per PCR in polipropilene contenenti da 1 a 96 pozzetti di reazione (in base al kit), ciascuna contenente 10 µl di primer liofilizzato precedentemente dispensato, polimerasi, dNTPs* e tampone. Ciascun test o striscia è confezionato singolarmente all'interno di un sacchetto in alluminio.
- 1x istruzioni d'uso.
- Le tabelle di interpretazione, le schede MSDS e il certificato di analisi possono essere scaricati dal sito Biofortuna www.biofortuna.com. Nel caso non si riesca ad ottenere questi documenti dal sito, contattare il proprio distributore locale.

*CleanAmp™ dNTPs sono concessi in licenza da Trilink Biotechnologies Inc per l'uso con i prodotti Biofortuna SSPGo.

5. Reagenti e materiali non forniti

- Pipette e puntali per pipette appropriati, per es. pipetta P10 con puntali filtro da 10 µl.
- Kit/dispositivo di isolamento del DNA.
- Spettrofotometro UV.
- Provette in polipropilene.
- Acqua sterile ad uso molecolare.
- Tappi o fogli sigillanti PCR. (I tappi delle strisce vengono forniti per i kit con provette in strisce)
- Termociclatore a 96 pozzetti con coperchio riscaldato. Le piastre e le provette per la PCR nei kit Biofortuna sono state validate per l'uso con la maggior parte dei termociclatori disponibili in commercio, compresi i termociclatori MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS e Techne TC-512. Modelli differenti potrebbero richiedere una ulteriore validazione da parte dell'operatore.
- Reagenti per elettroforesi su gel (agarosio, 0,5x TBE, marcatore di peso molecolare di DNA 1000 bp, 10 mg/ml di bromuro di etidio).
- Attrezzatura per elettroforesi su gel (vasche per il gel, alimentazione elettrica, sistema di documentazione gel con transilluminatore UV).

6. Avvertenze e precauzioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- I test devono essere eseguiti solamente da personale specializzato.
- Tutti i risultati di tipizzazione devono essere verificati da personale qualificato e, se utilizzati per una decisione clinica, devono essere confermati tramite un'altra metodologia di tipizzazione.
- Trattare tutti i reagenti in base alle norme di buona pratica di laboratorio.
- Le aree di pre e post-PCR devono essere mantenute separate. I materiali di post-PCR non devono essere portati nuovamente nell'area di pre-PCR.
- **Avvertenza rischio biologico:** trattare tutti gli emoderivati come potenzialmente infettivi.
- **Avvertenza rischio biologico:** il bromuro di etidio è un potenziale cancerogeno. Se impiegato, indossare sempre guanti, camice da laboratorio e occhiali protettivi.
- **Avvertenza rischio biologico:** fare attenzione quando si usano fonti UV - indossare sempre guanti, camice da laboratorio e occhiali protettivi. Evitare di guardare direttamente la fonte di luce UV.
- Le schede di sicurezza dei componenti (Material Safety Data Sheets, MSDS) sono disponibili sul sito www.biofortuna.com.

7. Conservazione e stabilità

I kit Biofortuna SSPGo devono essere conservati a 4-30°C. Una volta rimosse le strisce o le piastre per la PCR dai sacchetti in alluminio, i reagenti devono essere reidratati con DNA entro 3 ore. Per la data di scadenza fare riferimento a quanto riportato sulla confezione. Non utilizzare i prodotti successivamente alla data indicata.

I kit non devono essere usati nel caso il sacchetto sia strappato o perforato.

Assicurarsi dopo aver aggiunto il DNA che le strisce o le piastre per la PCR siano sigillate ermeticamente onde evitare l'evaporazione durante l'amplificazione PCR. Fare particolare attenzione ai lati e agli angoli.

8. Indicazioni d'uso

Requisiti del campione di DNA

Ciascuna reazione di analisi è ottimizzata per l'utilizzo di DNA compreso tra 50 e 100 ng, è però importante che ciascuna reazione venga reidratata esattamente con 10 µl di liquido. Pertanto l'analisi può essere eseguita con 10 µl di DNA a 5-10 ng/µl oppure può essere aggiunto prima un volume d'acqua in modo da permettere l'aggiunta di DNA ad una concentrazione più alta, per es. dispensando 9 ul di acqua e quindi 1 ul di DNA a 50-100 ng/µl. Poiché l'eparina inibisce la PCR si raccomanda di non estrarre il DNA da campioni di sangue eparinizzati. L' $OD_{260/280}$ del campione di DNA deve essere compreso tra 1,6 e 2 in base alla misurazione tramite spettrofotometria UV.

Indicazioni per la Pre-PCR

- i. Rimuovere una piastra o una striscia SSPGo dal sacchetto sigillato.
- ii. Prendere nota del numero di lotto, del numero del prodotto e della versione dei dosaggi.
- iii. È opportuno notare che la prima reazione di analisi di ciascun locus è sempre di colore rosso rispetto alle rimanenti reazioni di analisi.
- iv. Alcune piastre per la PCR contengono nell'ultimo pozzetto una reazione di 'controllo privo di template' integrale di colore porpora.
- v. Pipettare con attrezzatura sterile 10 µl di soluzione di DNA in ciascuna reazione della piastra o della striscia. Fare riferimento alla nota alla sezione 8 Requisiti del campione di DNA. Se la piastra contiene un 'controllo privo di template' integrale di colore porpora dispensarvi 10 µl di diluente del campione (senza DNA). Fare riferimento alla nota alla sezione 8 Controllo privo di template.
- vi. Assicurarsi che il DNA venga a contatto con i reagenti liofilizzati in ciascuna reazione prima di ogni processamento nel termociclatore. È possibile eseguire una breve fase di centrifugazione per assicurare che tutta la soluzione di DNA venga a contatto con i reagenti liofilizzati.
- vii. Sigillare le reazioni con un foglio sigillante o i tappi per le provette PCR. Per prevenire una eventuale evaporazione assicurarsi che il foglio chiuda in modo ermetico. Fare particolare attenzione a spigoli e angoli.
- viii. Posizionare la piastra o le strisce nel termociclatore. Assicurarsi che le provette siano completamente inserite nel blocco e che il coperchio aderisca completamente. La mancata osservanza di quanto descritto può invalidare la singola PCR. Con alcuni modelli di di termociclatori potrebbe essere necessario l'uso di cuscinetti o blocchi di compressione per ottenere una compressione efficace del prodotto nel blocco.
- ix. Avviare il programma di PCR (fare riferimento ai parametri per la PCR).

NOTA SULLA RISOSPENSIONE: assicurarsi che le miscele PCR vengano risospese con il campione di DNA entro tre ore dalla rimozione delle provette di reazione dal sacchetto in alluminio.

NOTA SUL CONTROLLO PRIVO DI TEMPLATE: alcuni kit includono un controllo privo di template (no template control, NTC) come ultima reazione della piastra. Questa reazione contiene un colorante porpora per permetterne la distinzione dal resto delle reazioni, la sua presenza in un kit viene indicata nelle tabelle di interpretazione allegate. L'NTC permette di rilevare la contaminazione della PCR o la contaminazione con DNA genomico del kit Biofortuna SSPGo eventualmente presente nell'acqua usata per risospesare il DNA. In presenza di contaminazione della PCR si potranno osservare ampliconi di dimensioni variabili, se la contaminazione è con DNA genomico si potrà osservare un amplicone di 187bp.

NOTA SUL CORRETTO PROFILO D'ALTEZZA DELLA STRISCIA/PIASTRA DI PCR: se si posizionano le piastre e le strisce nello stesso dispositivo per la PCR si raccomanda di posizionarle in modo che il profilo dell'altezza sia equivalente. Profili di altezza differenti potrebbero causare un contatto impreciso con il coperchio riscaldato dei dispositivi per la PCR. L'amplificazione PCR potrebbe risultare scarsa o non avvenire.

Parametri PCR

Utilizzare i seguenti parametri per la reazione di PCR. Assicurarsi che le velocità della rampa siano di almeno 1°C al secondo e attivare il coperchio riscaldato. Per informazioni d'uso complete fare riferimento al manuale d'impiego del fabbricante del termociclatore. I termociclatori devono essere calibrati in accordo alle regole di accreditamento dell'American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) o dell'European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturazione	94°C	5 minuti		
Denaturazione	96°C	15 secondi	←	10 cicli
Appaiamento	66°C	50 secondi		
Estensione	72°C	30 secondi		
Denaturazione	96°C	15 secondi	←	20 cicli
Appaiamento	64°C	50 secondi		
Estensione	72°C	30 secondi		
MANTENERE	15°C			

Elettroforesi su gel

Le seguenti istruzioni si riferiscono all'elettroforesi orizzontale su gel di agarosio. Preparare il gel di agarosio al 2% in tampone 0,5x TBE. Una volta raffreddatosi intorno ai 60°C dispensare bromuro di etidio raggiungendo una concentrazione finale di 0,5 µg/ml. Allestire il gel inserendo i pettini da microtitolazione (per es. 12x8 pozzetti con spazi di 9 mm). Una volta sistemato, rimuovere i pettini e immergere il gel in tampone 0,5x TBE. Trasferire da un minimo di 5 µl e un massimo di 10 µl da ciascuna piastra o striscia di reazione nel pozzetto corrispondente sul gel annotando la posizione di ciascuna reazione. Per determinare la dimensione dei prodotti di reazione, può essere di ausilio l'utilizzo di una scala da 100 bp. Far correre il gel per 20 minuti a 10 V/cm.

Per dettagli specifici relativi all'attrezzatura, fare riferimento alle istruzioni d'uso del fabbricante del sistema di elettroforesi. I gel dovrebbero essere archiviati utilizzando un sistema di acquisizione di immagini con transilluminatore ad UV.

9. Interpretazione

I kit SSPGo sono concepiti in modo tale da poter determinare i risultati manualmente usando le tabelle di interpretazione disponibili sul sito www.biofortuna.com. In caso di problemi con l'accesso al sito contattare il proprio distributore locale.

Apporre la fotografia del gel sul modulo di interpretazione corrispondente facendo coincidere i numeri di kit e versione. Esaminare l'immagine del gel. Ciascuna reazione deve contenere una banda di controllo positivo. Fare riferimento alle tabelle di interpretazione in quanto tale banda può avere una dimensione differente nei differenti prodotti SSPGo. In presenza di bande di un allele specifico, le bande del controllo interno potrebbero apparire più deboli. Se è presente una banda di un allele specifico ma non una banda di controllo, tale risultato va tuttavia considerato come positivo. Ignorare qualsiasi banda inferiore a 70bp poiché si tratta di primer non incorporati.

Determinare le reazioni positive. Le reazioni positive vengono indicate da bande della dimensione prevista, come specificato nelle tabelle di interpretazione. Tenere presente che può si potrebbero ottenere più prodotti di amplificazione con dimensioni differenti in una determinata reazione – si tratta di reazioni multiplex, che sono annotate nelle tabelle di interpretazione.

Mettere a confronto le reazioni positive con le tabelle di interpretazione. Un risultato positivo in una reazione indica la presenza di almeno uno degli alleli elencati, per lo stesso, nella tabella di interpretazione. Ogni allele può essere amplificato in diverse provette – se l'allele è presente dovrà esserci una reazione positiva in tutte le corrispondenti reazioni.

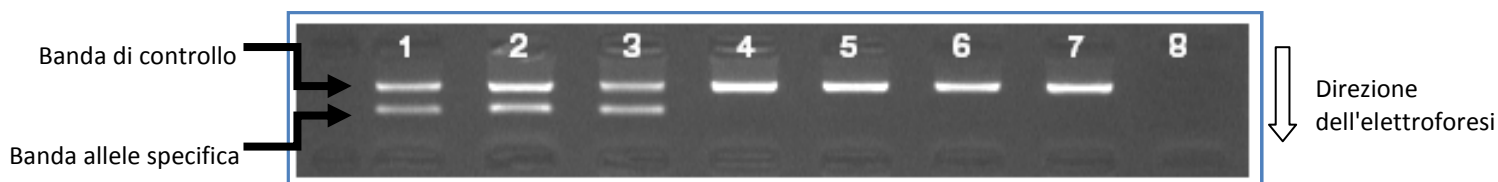


Fig. 1 Esempi di reazioni positive, indicate dalla presenza di bande allele specifiche e bande di controllo (reazioni 1-3); reazioni negative, indicate dalla presenza di bande di controllo ma dall'assenza di bande allele specifiche (reazioni 4-7); e una reazione fallita, indicata dall'assenza di bande (reazione 8).

Assicurarsi che la versione del kit coincida con la versione della tabella di interpretazione.

10. Garanzia di qualità e controllo

Per ciascun lotto SSPGo viene verificata la qualità prima che il prodotto lasci Biofortuna. Per assicurare una prestazione corretta, campioni di ciascun kit vengono verificati mediante l'utilizzo di un pannello definito di campioni di DNA umano. Ciascuna reazione è stata validata a fronte di almeno 48 campioni di linea cellulare di DNA ben caratterizzati. Biofortuna raccomanda a ciascun laboratorio di validare internamente qualsiasi nuovo prodotto di tipizzazione prima di utilizzarlo per campioni clinici. La tipizzazione diagnostica deve essere eseguita solamente da personale specializzato e qualificato, e i risultati devono essere sottoposti a verifica incrociata con un altro operatore specializzato.

11. Bibliografia

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

12. Legenda dei simboli utilizzati

- ▽ Numero di test
- CE REP Mandatario nella CE
- 📖 Consultare le istruzioni per l'uso
- 🏭 Sito di produzione
- IVD Diagnostico *in vitro*
- 🕒 Data di scadenza
- 4°C ↕ 30°C Temperatura di conservazione
- LOT Numero di lotto

13. Indirizzo fabbricante

Biofortuna Ltd
1 Hawkshead Road
Croft Business Park
Bromborough, CH62 3RJ, UK
T: +44 (0) 151 334 0182
E: info@biofortuna.com
W: www.biofortuna.com



14. Traduzioni

Française:	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
České:	Překlady k dispozici
Danske:	Tilgængelige oversættelser
Έλληνες:	διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítások
Norske:	Oversettelser tilgjengelig
Polska:	Dostępne tłumaczenia
Português:	Traduções disponíveis
Россию:	Переводы доступны
Slovenskému:	Preklady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

15. Guida all'individuazione e soluzione dei problemi SSPGo

Problema	Causa probabile	Soluzione
Nessuna amplificazione nelle reazioni	Concentrazione di DNA usata non corretta	Misurare la quantità di DNA e assicurarsi che per ciascuna reazione sia stato aggiunto un totale di 50 - 100 ng di DNA in un volume di 10 µl.
	Inibitori della PCR presenti nel campione di DNA	Evitare l'uso di sangue eparinizzato, se inevitabile, estrarre il DNA dai linfociti intatti lavati in modo tale che l'eparina non venga a contatto con il DNA. Sono stati descritti i protocolli che utilizzano l'eparinasi per rimuovere l'eparina dai campioni di DNA. Estrarre nuovamente il DNA. Per l'uso del kit di estrazione del DNA fare riferimento alle linee guida del produttore.
	È stato utilizzato un campione di DNA di scarsa qualità	Misurare la qualità di DNA. Nella spettrofotometria UV il rapporto A260/A280 deve essere di 1,6 – 2,0. Prima dell'uso, assicurarsi che il DNA sia completamente risospeso nella soluzione.
	I reagenti non sono stati completamente risospesi	Una volta aggiunto il DNA assicurarsi che i pellet siano completamente reidratati. Se necessario, centrifugare brevemente la piastra. Assicurarsi che vengano utilizzati 10 µl di soluzione di DNA per ciascuna reazione.
	Il termociclatore non è impostato correttamente	Assicurarsi che il programma PCR sia stato impostato correttamente, secondo le istruzioni d'uso. Assicurarsi che il coperchio riscaldato del termociclatore sia ben chiuso. Per ulteriori informazioni fare riferimento alle istruzioni d'uso del termociclatore.
	Problemi con l'elettroforesi	Assicurarsi che vi sia corrente nella vasca dell'elettroforesi – verificare l'alimentatore e pulire gli elettrodi. Far correre il gel in tampone 0,5X TBE. Assicurarsi che vengano usati 0,5 µg/ml di bromuro di etidio fresco. Verificare che vi sia sufficiente illuminazione UV durante la produzione dell'immagine dei gel. Per ulteriori istruzioni fare riferimento alle istruzioni d'uso del fabbricante della vasca del gel e dell'alimentatore.
Piastre non sigillate correttamente.	Piastre non completamente sigillate possono causare l'evaporazione durante la PCR. Biofortuna fornisce fogli sigillanti raccomandati (numero prodotto BF-40-11).	

Problema	Causa probabile	Soluzione
		<p>Assicurarsi che tutti i pozzetti siano adeguatamente sigillati. Prestare particolare attenzione ai pozzetti in prossimità dei lati della piastra o della striscia per la PCR.</p>
<p>Perdite casuali del controllo e/o degli ampliconi allele specifici.</p>	<p>Errori riguardanti il gel</p>	<p>Assicurarsi di aver caricato tutti i pozzetti nel gel nell'ordine corretto e che in ciascuno sia stato dispensato lo stesso volume di reazione PCR.</p> <p>Calibrare le pipette come descritto nelle istruzioni d'uso del fabbricante.</p> <p>Verificare che i pozzetti si siano formati nel gel in modo corretto.</p> <p>Fare attenzione nel rimuovere i pettini poiché è possibile che venga danneggiato il fondo dei pozzetti.</p> <p>Assicurarsi che l'agarosio sia completamente dissolto prima di colare il gel.</p> <p>Assicurarsi che il gel non venga fatto correre troppo a lungo, dato che gli ampliconi più piccoli potrebbero perdersi alla fine del gel.</p> <p>Assicurarsi che il gel sia stato fatto correre abbastanza da permettere alle bande di separarsi.</p> <p>Utilizzare una soluzione di bromuro di etidio fresca.</p>
	<p>Problemi del termociclatore</p>	<p>Si possono verificare degli errori, in particolare intorno ai margini del dosaggio a causa di una chiusura insufficiente del coperchio. Ciò può determinare una evaporazione e condensazione della reazione PCR a metà provetta, provocando un errore nella reazione di PCR.</p> <p>Attenersi alle indicazioni del fabbricante relative alla manutenzione e calibrazione del proprio termociclatore.</p> <p>Verificare che i parametri della reazione di PCR siano corretti, secondo le istruzioni d'uso.</p>
	<p>Problemi di evaporazione</p>	<p>Assicurarsi che tutti i pozzetti siano adeguatamente sigillati. Prestare particolare attenzione ai pozzetti in prossimità dei lati della piastra o delle strisce per la PCR.</p> <p>Assicurarsi che il coperchio riscaldato sia attivato e che il coperchio eserciti sufficiente pressione. Biofortuna fornisce fogli sigillanti raccomandati (numero prodotto BF-40-11).</p>
	<p>Errori sporadici dovuti a problemi del DNA</p>	<p>Assenza di DNA: assicurarsi che il DNA sia presente in tutti i pozzetti.</p> <p>Volume errato: assicurarsi che a ciascuna reazione</p>

Problema	Causa probabile	Soluzione
		<p>vengano aggiunti 10 µl di soluzione di DNA.</p> <p>Aggiunta eccessiva di DNA: concentrazioni superiori a 200 ng possono causare un errore della PCR.</p> <p>Contaminanti presenti nel DNA possono causare errori di amplificazione sporadici o diffusi.</p>
Immagine del gel opaca	DNA	<p>Verificare la concentrazione e la purezza del DNA.</p> <p>L'aggiunta eccessiva di DNA alle reazioni della PCR può causare immagini del gel opache.</p>
Amplificazione debole	Problema di concentrazione del DNA	<p>Verificare che la concentrazione di DNA non sia troppo alta o troppo bassa. Utilizzare 100 ng di DNA per reazione, in 10 µl.</p>
	Problemi con il termociclatore	<p>Attenersi alle indicazioni del fabbricante relative alla manutenzione e calibrazione del proprio termociclatore.</p> <p>Verificare che i parametri della PCR siano corretti, secondo le istruzioni d'uso.</p>
	Errori del gel	<p>Assicurarsi di aver aggiunto a ciascun pozzetto lo stesso volume di reazione compreso tra 5 µl e 10 µl.</p> <p>Calibrare le pipette come descritto nelle istruzioni d'uso del fabbricante.</p> <p>Utilizzare una soluzione di bromuro di etidio fresca.</p>
Amplificazione non specifica	Problema di concentrazione del DNA	<p>Verificare che la concentrazione di DNA non sia troppo alta o troppo bassa. 50 - 100 ng di DNA per reazione, in 10 µl.</p>
	Reazioni caricate nell'ordine errato	<p>Verificare il corretto allineamento della reazione di PCR con il pozzetto del gel corrispondente.</p> <p>Prevenire un travaso dai pozzetti adiacenti nell'elettroforesi evitando un eccessivo riempimento e prima di rimuovere i pettini assicurarsi che il gel si sia solidificato.</p>
	Identificato nuovo allele	<p>Gli alleli precedentemente non sequenziati potrebbero presentarsi con un nuovo pattern di amplificazione. Se si utilizzano schede di interpretazione vecchie, si consiglia di scaricare gli aggiornamenti relativi all'allineamento più recenti dal sito www.biofortuna.com. Se tale provvedimento non consente un aggiustamento del nuovo pattern si consiglia di eseguire la verifica utilizzando un kit Biofortuna differente oppure cercare di identificare la sequenza tramite la tipizzazione della sequenza stessa. In alternativa è possibile contattare il servizio tecnico di Biofortuna per ottenere assistenza e maggiori informazioni.</p>
Il pattern di amplificazione non è	Un artefatto viene interpretato incorrettamente	<p>Verificare che le tabelle di interpretazione siano della versione specifica per una corretta interpretazione della</p>

Problema	Causa probabile	Soluzione
interpretabile	come una banda specifica	dimensione della banda. Verificare che tutte le amplificazioni specifiche siano corrette in base alla dimensione o se un artefatto (carry-over, dimero di primer) sia stato interpretato erroneamente come amplificazione.
	Reazioni caricate nell'ordine errato	Verificare l'allineamento della PCR con i pozzetti del gel.
	Singolo errore di PCR	Verificare che tutti i controlli positivi interni siano presenti. Interpretare nuovamente senza le reazioni mancanti.
	Piccoli ampliconi mancanti	L'elettroforesi è stata eseguita troppo a lungo, gli ampliconi piccoli sono corsi oltre la fine del gel, o oltre il fronte del bromuro di etidio o sono dispersi in seguito all'inserimento in un pozzetto di un gel precedente. Utilizzare le condizioni per l'elettroforesi idonee al proprio sistema di gel.
	Identificato nuovo allele nel campione	Occasionalmente si scopre che nuovi alleli possono accrescere il pattern di amplificazione e che questo non è riscontrabile tra gli alleli esistenti. Si prega di contattare il proprio distributore locale.