

Instruções de Utilização



IdentiClone® *IGH* Gene Clonality Assay

Para a identificação de rearranjos clonais da cadeia pesada das imunoglobulinas.

IVD Para diagnóstico *in vitro*



 Condições de armazenamento: **-85°C a -65°C**

(os controles de ADN podem ser separados dos kits de ensaio e armazenados de 2°C a 8°C)

Ref.ª Catálogo

Produtos

Quantidade

REF 91010061

IdentiClone *IGH* Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection

33 Reações

REF 91010081

IdentiClone *IGH* Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection

330 Reações

Índice

1.	UTILIZAÇÃO PRETENDIDA	3
2.	RESUMO E EXPLICAÇÃO DO ENSAIO.....	3
2.1.	Introdução	3
2.2.	Resumo.....	3
3.	PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO.....	4
3.1.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	4
3.2.	Deteção Diferencial por Fluorescência.....	4
4.	REAGENTES.....	5
4.1.	Componentes dos Reagentes	5
4.2.	Advertências e Precauções.....	6
4.3.	Conservação e Manuseamento.....	6
5.	EQUIPAMENTOS.....	7
5.1.	Termociclador	7
5.2.	Aparelhos de Eletroforese Capilar ABI.....	7
6.	RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	8
6.1.	Precauções	8
6.2.	Substâncias Interferentes.....	8
6.3.	Requisitos e Manuseamento de Amostras	8
6.4.	Preparação de Amostras	8
6.5.	Armazenamento de Amostras.....	8
7.	PROCEDIMENTO DO ENSAIO	9
7.1.	Materiais Incluídos.....	9
7.2.	Materiais Necessários (não incluídos)	9
7.3.	Preparação de Reagentes	10
7.4.	Amplificação.....	11
7.5.	Deteção por fluorescência ABI	12
7.6.	Controlo de Qualidade	13
7.7.	Controlos positivos recomendados	13
8.	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	14
8.1.	Análise.....	14
8.2.	Interpretação da amostra	14
9.	LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO.....	15
10.	VALORES ESPERADOS	15
10.1.	Tamanho esperado dos produtos amplificados	15
10.2.	Dados de Amostras.....	16
11.	CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	18
12.	BIBLIOGRAFIA.....	18
13.	ASSISTÊNCIA TÉCNICA E APOIO AO CLIENTE.....	18
14.	SÍMBOLOS	19
15.	AVISO LEGAL.....	19
15.1.	Garantia e Responsabilidade.....	19
15.2.	Patentes e Marcas Registadas	19

1. Utilização Pretendida

O ensaio IdentiClone *IGH* Gene Clonality Assay é um produto para diagnóstico *in vitro* destinado à detecção baseada em PCR de rearranjos clonais da cadeia pesada de genes de imunoglobulina em doentes com suspeita de linfoproliferações. Especificamente, o *IGH* Gene Clonality Assay pode ser utilizado para:

- Identificar clonalidade em distúrbios linfoproliferativos atípicos
- Fornecer apoio ao diagnóstico diferencial entre lesões reativas e malignidades hematológicas⁴
- Atribuir uma linhagem presumível em distúrbios linfoproliferativos monoclonais maduros
- Identificar marcadores tumorais específicos (rearranjos de genes de *IGH*) para monitorização pós-tratamento
- Monitorizar e avaliar a recidiva da doença

2. Resumo e Explicação do Ensaio

2.1. Introdução

Durante a ontogenia, ocorrem rearranjos de genes recetores de antigénios em linfócitos B e T. Este rearranjos génicos geram produtos únicos para cada célula em termos de comprimento e sequência. Assim sendo, podem ser utilizados ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar populações de linfócitos derivadas de uma única célula detetando-se os rearranjos genéticos V-J únicos presentes nestes loci de recetores de antigénios.¹ Este ensaio de PCR utiliza uma série de primers consenso do ADN direcionados para as regiões genéticas conservadas no interior do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas. Este teste é utilizado para detetar a partir do ADN a grande maioria das malignidades de linfócitos B. Os produtos do teste podem ser analisados através de diversos formatos de detecção, incluindo eletroforese em gel e eletroforese capilar.

Os ensaios IdentiClone da Invivoscribe representam uma abordagem quanto aos testes de clonalidade baseados em PCR. Estes ensaios padronizados foram cuidadosamente otimizados testando-se controlos positivos e negativos com master mixes multiplex. Após o desenvolvimento do ensaio, foi realizada uma extensa validação, incluindo testes a mais de 400 amostras clínicas utilizando-se a Classificação Revisada Europeia-Americana de Linfomas (REAL - Revised European-American Lymphoma Classification). Os testes foram realizados em mais de trinta eminentes centros de análise independentes em toda a Europa, num estudo colaborativo denominado BIOMED-2 Concerted Action.²

Os ensaios baseados em detecção ABI não conseguem detetar de forma fiável populações clonais que compreendam menos de 1% da população total de linfócitos. Os resultados das análises de clonalidade molecular devem ser sempre interpretados no contexto de dados clínicos, histológicos e imunofenotípicos.

2.2. Resumo

Este kit de testes inclui seis (6) master mixes. As master mixes dos *IGH* Tube A, B e C (*IGH* Tube A, B e C) são direcionadas para as regiões framework 1, 2 e 3 (respetivamente) dentro da região variável e a região de junção do locus da cadeia pesada das imunoglobulinas. As master mixes dos *IGH* Tube D and E (*IGH* Tube D e E) são direcionadas para as regiões de diversidade e junção. Por último, a master mix Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular) tem como alvo vários genes e gera uma série de amplicons com 96, 197, 297, 397 e 602 pares de bases (bp), de forma a garantir que a qualidade e a quantidade de ADN introduzida é adequada para produzir um resultado válido. Nos ensaios Invivoscribe Gene Clonality Assays, é utilizado um único programa de termociclador e metodologias de detecção similares. Isto melhora a consistência e facilita a formação para uma vasta gama de ensaios diferentes.

Este ensaio é baseado no estudo EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



3. Princípios do Procedimento

3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

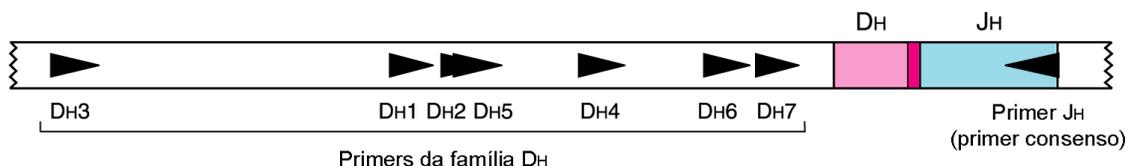
Os ensaios de PCR são habitualmente utilizados para a identificação de populações clonais de células B. Estes testes amplificam o ADN entre primers que têm como alvo a framework conservada (FR) das regiões variáveis (V) e as regiões de junção (J) conservadas (*IGH* Tubes A, B, and C - Tubos IGH A, B e C), bem com as regiões de diversidade (D) e de junção (*IGH* Tubes D and E - Tubos IGH D e E). Estas regiões conservadas encontram-se em um dos lados de uma área dentro da região V-J, onde ocorrem rearranjos genéticos programados durante a maturação de todos os linfócitos B e T. Os genes de recetores de antígenos que sofrem rearranjos constituem as cadeias pesadas e as cadeias leves das imunoglobulinas nas células B, e os genes de recetores das células T nas células T. Cada célula B e T contém um único rearranjo V-J produtivo com um comprimento e sequência únicos. Assim sendo, quando o ADN de uma população normal ou policlonal é amplificado utilizando primers de ADN que flanqueiam a região V-J, é gerada uma curva em forma de sino (distribuição gaussiana) de produtos de amplificação dentro de um intervalo de tamanho esperado. A distribuição gaussiana reflete a população heterogénea dos rearranjos V-J. (em determinados casos, quando não está presente ADN de linfócitos, não é observado nenhum produto.) O ADN de amostras que contêm uma população clonal produzem um ou dois produtos de amplificação (amplicons) proeminentes num contexto policlonal diminuído.



Tubo A: Primers 6 VH-FR1 + Primer consenso JH

Tubo B: 7 Primers VH-FR2 + Primer consenso JH

Tubo C: Primers 7 VH-FR3 + Primer consenso JH



Tubo D: Primers 6 DH + Primer consenso JH

Tubo E: Primer DH7 + Primer consenso JH

Figura 1. Representação simplificada da organização de um gene rearranjado de cadeia pesada das imunoglobulinas no cromossoma 14. As setas pretas representam as posições relativas dos primers direcionados para as regiões de framework conservadas (FR1-3) e de diversidade (D_H1-7) e os segmentos do gene J_H de consenso a jusante. Os produtos de amplificação gerados a partir de cada uma destas regiões podem ser detetados diferencialmente quando são utilizados conjuntos de primers fluorescentes com aparelhos de eletroforese capilar que utilizam a deteção diferencial por fluorescência.

Uma vez que os genes de recetores de antígenos são polimórficos (consistindo numa população heterogénea de sequências de ADN relacionadas), é difícil empregar um único conjunto de primers de sequenciação de ADN que tenha como alvo todas as regiões conservadas a flanquear ao redor do rearranjo V-J. A diversidade da região N e a mutação somática baralham ainda mais as sequências de ADN nestas regiões. Assim sendo, são necessárias master mixes multiplex que têm como alvo várias regiões FR, de forma a identificar a maioria dos rearranjos clonais. Conforme indicado, os rearranjos clonais são identificados como produtos proeminentes de tamanho único com o contexto de produtos de amplificação de diferentes tamanhos, que geram uma distribuição gaussiana em torno de um rearranjo de tamanho médio, estatisticamente favorecido. Tenha-se em atenção que os primers que amplificam as diferentes regiões FR, localizadas em três secções diferentes no gene da cadeia pesada, originam uma gama de produtos V-J com diferentes tamanhos correspondentes.

3.2. Deteção Diferencial por Fluorescência

A deteção diferencial por fluorescência é comumente utilizada para resolver os produtos de amplificação de diferentes tamanhos, utilizando um aparelho de eletroforese capilar. Os primers podem ser conjugados com vários corantes fluorescentes diferentes (fluoróforos) para que possam produzir diferentes espectros de emissão após a excitação por laser no aparelho de eletroforese capilar. Desta forma, diferentes corantes fluorescentes podem corresponder a diferentes regiões-alvo. Este sistema

de deteção resulta em sensibilidade inigualável, resolução de um único nucleótido, deteção diferencial de produto e quantificação relativa. Além disso, a utilização de geles de agarose e poliácridamida, bem como a utilização de carcinógenos, como o brometo de etídio, podem ser praticamente eliminadas. Adicionalmente, a deteção diferencial permite a interpretação precisa, reprodutível e objetiva dos produtos específicos para o primer e o arquivamento automático dos dados. A reprodutibilidade inter e intraensaio na determinação do tamanho utilizando eletroforese capilar é de aproximadamente 1 a 2 nucleótidos. Esta reprodutibilidade e sensibilidade associadas ao arquivamento automático dos dados da amostra permitem a monitorização, rastreamento e comparação de dados de doentes individuais ao longo do tempo.

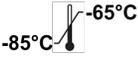
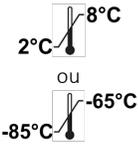
4. Reagentes

4.1. Componentes dos Reagentes

Tabela 1. Kits Disponíveis

Ref. ^a Catálogo	Descrição	Quantidade Unitária
REF 91010061	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reações
REF 91010081	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reações

Tabela 2. Componentes dos Kits

Reagente	Ref. ^a Catálogo	Componentes dos Reagentes (ingredientes ativos)	Quantidade e Unitária	91010061 Número de Unidades	91010081 Número de Unidades	Temp. de Conservação
Master Mixes	21010011CE	<i>IGH</i>Tube A – 6FAM Oligonucleótidos múltiplos direcionados para a região do framework 1 do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas numa solução salina tamponada.	1500 µl	1	10	
	21010101CE	<i>IGH</i>Tube B – 6FAM Oligonucleótidos múltiplos direcionados para a região do framework 2 do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas numa solução salina tamponada.	1500 µl	1	10	
	21010031CE	<i>IGH</i>Tube C – HEX Oligonucleótidos múltiplos direcionados para a região do framework 3 do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas numa solução salina tamponada.	1500 µl	1	10	
	21010041CE	<i>IGH</i>Tube D – HEX Oligonucleótidos múltiplos direcionados para as regiões de diversidade e regiões de junção do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas numa solução salina tamponada.	1500 µl	1	10	
	21010051CE	<i>IGH</i>Tube E – 6FAM Oligonucleótidos múltiplos direcionados para as regiões de diversidade e regiões de junção do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas numa solução salina tamponada.	1500 µl	1	10	
Master Mix com controlo de amplificação com molde	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Múltiplos oligonucleótidos direcionados para genes de manutenção.	1500 µl	1	10	
ADN de Controlo Positivo	40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA 200 µg/ml de ADN em 1/10 de solução TE	100 µl	1	5	
	40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA 200 µg/ml de ADN em 1/10 de solução TE	100 µl	1	5	
	40881390	IVS-0024 Clonal Control DNA 200 µg/ml de ADN em 1/10 de solução TE	100 µl	1	5	
	40880430	IVS-0008 Clonal Control DNA 200 µg/ml de ADN em 1/10 de solução TE	100 µl	1	5	
ADN de Controlo Negativo (Normal)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 µg/ml de ADN em 1/10 de solução TE	100 µl	1	5	

Nota: Não são utilizados conservantes no fabrico deste kit.

4.2. Advertências e Precauções

- **IVD** Este produto destina-se a diagnóstico *in vitro*.
- Utilize este kit de ensaio como um sistema. Não substitua com reagentes de outros fabricantes. A diluição, redução dos volumes de reações de amplificação ou outros desvios deste protocolo podem afetar o desempenho desta análise e/ou anular qualquer sublicença limitada que acompanha a compra deste kit de teste.
- Os materiais são estáveis até à data de validade indicada no rótulo, quando armazenados e manuseados como indicado. Não utilize os kits após a sua data de validade.
- O cumprimento rigoroso do protocolo irá garantir um desempenho e reprodutibilidade ótimos. Certifique-se de que é usado o programa correto do termociclador, uma vez que outros programas poderão fornecer dados imprecisos/erróneos, tais como resultados falsos positivos e falsos negativos.
- Não misture nem combine reagentes de kits com diferentes números de lote.
- Use equipamento de proteção individual adequado e siga as boas práticas laboratoriais e precauções universais ao trabalhar com amostras. As amostras devem ser manuseadas em instalações de contenção de segurança biológica aprovadas e só devem ser abertas em câmaras de segurança biológica certificadas. É recomendada a utilização de água com qualidade para biologia molecular para a preparação do ADN de amostra.
- Devido à sensibilidade analítica desta análise, deve ser tomado extremo cuidado para evitar a contaminação dos reagentes ou misturas de amplificação com amostras, controlos ou materiais amplificados. Todos os reagentes devem ser cuidadosamente controlados relativamente a sinais de contaminação (*p. ex.*, controlos negativos que originam sinais positivos). Elimine reagentes suspeitos de contaminação.
- Para minimizar a contaminação, utilize luvas limpas ao manusear amostras e reagentes e limpe regularmente as áreas de trabalho e as pipetas antes de efetuar a PCR.
- A autoclavagem não elimina a contaminação de ADN. O fluxo de trabalho no laboratório de PCR deve ser unidirecional: começar pela preparação da master mix, passar para a preparação das amostras e, em seguida, para a amplificação e, finalmente, para a deteção. Não coloque ADN amplificado nas áreas designadas para a master mix ou para a preparação de amostras.
- Todas as pipetas, pontas de pipeta e equipamentos utilizados numa determinada área devem ser exclusivos dessa área do laboratório.
- Sempre que possível, deve ser utilizado material plástico estéril e descartável, para evitar RNase, DNase ou contaminação cruzada.

4.3. Conservação e Manuseamento

- Para qualquer período de tempo superior à utilização imediata, **consERVE os kits entre -85°C e -65°C**.
- A temperatura de conservação ótima para os controlos de ADN é entre 2°C e 8°C, mas os controlos de ADN também podem ser armazenados entre -85°C e -65°C.
- Todos os reagentes e controlos devem ser descongelados e misturados em vórtex, ou completamente misturados, antes da utilização, de forma a assegurar que estão completamente ressuspensos. A mistura em vórtex excessiva pode romper a cadeia de ADN e fazer com que os primers rotulados percam os respetivos fluoróforos.
- Os materiais são estáveis até à data de validade indicada no rótulo, quando armazenados e manuseados como indicado. Não utilize os kits após a sua data de validade.
- Devido a elevadas concentrações de sal, as master mixes de PCR são sensíveis aos ciclos de congelamento/descongelamento. Aliquite as master mixes em tubos com tampa roscada e O-ring estéreis, se necessário.

5. Equipamentos

5.1. Termociclador

- Função ou Utilização: Amplificação de amostras de ADN
- Aparelho sugerido: termociclador Veriti™ ou equivalente
- Características de desempenho e especificação:
 - Gama térmica mínima: 15°C a 96°C
 - Velocidade de rampa mínima: 0,8°C/seg
- Siga os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração e manutenção do fabricante.
- Consulte a secção 7.4 *Amplificação* para informações sobre o programa do termociclador.

5.2. Aparelhos de Eletroforese Capilar ABI

- Utilização ou Função: Detecção e análise de fragmentos
- Características de desempenho e especificação:
 - Os aparelhos de eletroforese capilar que se seguem cumprem as necessidades de desempenho do presente ensaio:
 - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capillary) (Analisador Genético ABI 310 - 1 capilar)
 - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analisador Genético ABI 3100 Avant - 4 capilares)
 - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaries) (Analisador Genético ABI 3100 - 16 capilares)
 - ABI 3130 Genetic Analyzer (4 capillaries) (Analisador Genético ABI 3130 - 4 capilares)
 - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16 capillaries) (Analisador Genético ABI 3130xL - 16 capilares)
 - ABI 3500 Genetic Analyzer (8 capillaries) (Analisador Genético ABI 3500 - 8 capilares)
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24 capilares) (Analisador Genético ABI 3500xL - 24 capilares)
- Siga os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração e manutenção do fabricante.
- O aparelho ABI utilizado deve ser calibrado com as Matrix Standards (Normas de Matriz) adequadas, conforme descrito na secção 7.2: *Materiais Necessários (não incluídos)*.
- Utilize as predefinições para o seu tipo de polímero e capilar.
- Consulte a secção 7.5: Detecção por fluorescência ABI para a preparação da amostra.

6. Recolha e Preparação de Amostras

6.1. Precauções

As amostras biológicas de seres humanos podem conter materiais potencialmente infecciosos. Todas as amostras devem ser manuseadas de acordo com a Norma OSHA relativa a Agentes Patogénicos Transmitidos pelo Sangue ou de acordo com o Nível 2 de Biossegurança.

6.2. Substâncias Interferentes

As seguintes substâncias são conhecidas por interferir com a PCR:

- Quelantes de catiões divalentes
- Pontas de pipeta de baixa retenção
- EDTA (não significativo em baixas concentrações)
- Heparina

6.3. Requisitos e Manuseamento de Amostras

Este ensaio testa **ADN genómico** com as seguintes origens:

- 5 ml de sangue periférico, biópsia de medula óssea ou aspirado de medula óssea com anticoagulante heparina ou EDTA (armazenado entre 2°C e 8°C e enviado à temperatura ambiente)
- Cubo de tecido com pelo menos 5 mm (armazenado e enviado congelado ou armazenado e enviado em RPMI 1640 à temperatura ambiente ou em gelo)
- 3 µg de ADN genómico (armazenado entre 2°C e 8°C e enviado à temperatura ambiente)
- Tecido ou lâminas fixadas em formalina e impregnadas em parafina (armazenado e enviado à temperatura ambiente)

6.4. Preparação de Amostras

Extraia o ADN genómico das amostras do doente, logo que possível. Ressuspenda o ADN a uma concentração final entre 100 µg e 400 µg por ml em 1/10 de solução TE (Tris-HCl 1 mM, pH 8.0; EDTA 0,1 mM) ou em água com qualidade para biologia molecular ou USP. Este é um sistema de ensaio robusto. Uma ampla variedade de concentrações de ADN irão gerar um resultado válido. Por consequência, não é geralmente necessário quantificar nem ajustar as concentrações de ADN. Testar a amostra de ADN com a master mix Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular) garantirá que está presente ADN com qualidade e quantidade suficientes para produzir um resultado válido.

6.5. Armazenamento de Amostras

Armazenar o ADN genómico entre 2°C e 8°C ou entre -85°C e -65°C até à utilização.

7. Procedimento do Ensaio

7.1. Materiais Incluídos

Tabela 3. Componentes dos Kits

Ref.ª Catálogo	Descrição
21010011CE	IGH Tube A – 6FAM
21010101CE	IGH Tube B – 6FAM
21010031CE	IGH Tube C – HEX
21010041CE	IGH Tube D – HEX
21010051CE	IGH Tube E – 6FAM
20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA
40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA
40881390	IVS-0024 Clonal Control DNA
40880430	IVS-0008 Clonal Control DNA
40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA

7.2. Materiais Necessários (não incluídos)

Tabela 4. Material Necessário (não incluído)

Reagente/Material	Reagentes/Materiais e Fornecedores Recomendados	Ref.ª Catálogo	Notas
Polimerase do ADN	Roche: <ul style="list-style-type: none"> DNA Polymerase EagleTaq Invivoscribe, Inc <ul style="list-style-type: none"> FalconTaq DNA Polymerase ou equivalente 	05206944190 60970130	N/A
Água destilada em recipiente de vidro, desionizada e com qualidade para biologia molecular ou USP	N/A	N/A	Estéris e sem DNase e Rnase.
Pipetas calibradas	Rainin: <ul style="list-style-type: none"> Pipetas P-2, P-20, P-200 e P-1000 ou pipetas SL-2, SL-20, SL-200 e SL-1000 	N/A	Devem ser capazes de medir com precisão volumes entre 1 µl e 1000 µl.
Termociclador	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Veriti Dx Thermal Cycler Bio-Rad: <ul style="list-style-type: none"> MJ Research PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> PE 9600 ou PE 9700 	N/A	N/A
Agitador vórtex	N/A	N/A	N/A
Placas ou tubos para PCR	N/A	N/A	Estéreis
Pontas de pipeta com filtro	N/A	N/A	Estéreis, sem Rnase/Dnase/pirogénios
Tubos de microcentrifugadora	N/A	N/A	Estéreis
Aparelho de Eletroforese Capilar ABI	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> ABI 310, 3100, ou 3500 series 	N/A	N/A
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di™ Formamide 	4311320	N/A

Tabela 4. Material Necessário (não incluído)

Reagente/Material	Reagentes/Materiais e Fornecedores Recomendados	Ref. ^a Catálogo	Notas
Tamanhos padrão	Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di Formamide com tamanhos padrão rotulados com ROX para ABI 3100 	60980061	N/A
	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Para ABI 3100 ou 3130 instruments: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ - 400HD [ROX]™ Para ABI 3500 instruments: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan – 600 [LIZ]™ v2.0 	402985 4408399	
	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Para ABI 3100 e 3130 instruments: <ul style="list-style-type: none"> DS-30 Matrix Standard kit (Dye Set D) Para ABI 310 instruments: <ul style="list-style-type: none"> NED Matrix Standard e Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX] Para ABI 3500 instruments: <ul style="list-style-type: none"> DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) 	4345827 402996 401546 4345833	
Polímero	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Polymer POP-4™: <ul style="list-style-type: none"> POP-4 para 310 Genetic Analyzers POP-4 para 3100/3100-Avant Genetic Analyzers POP-4 para 3130/3130xL Genetic Analyzers Polymer POP-7™: <ul style="list-style-type: none"> POP-7 para 3130/3130xL Genetic Analyzers POP-7 para 3500/3500xL Genetic Analyzers 	402838 4316355 4352755 4352759 4393714	N/A
	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA 	402824	
Tampão	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA 	402824	Diluir a 1:10 em água estéril antes da utilização

7.3. Preparação de Reagentes

- Todas as amostras desconhecidas podem ser testadas utilizando-se a master mix Specimen Control Size Ladder. Isto serve para garantir que não estão presentes inibidores de amplificação e existe ADN com qualidade e quantidade suficientes para gerar um resultado válido.
- Os resultados de testes únicos são válidos. No entanto, recomenda-se o teste em **duplicado**, quando possível. Se o teste em duplicado originar resultados inconsistentes, teste e avalie novamente a amostra, se necessário.
- Testar controlos **positivos, negativos e sem molde** para cada master mix.
- Reunir diversas amostras em lote num teste para evitar desperdiçar controlo negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA). Caso a execução em lote não seja exequível no seu laboratório, o IVS-0000 Polyclonal Control DNA também pode ser adquirido em separado.

7.3.1. Com as mãos protegidas com luvas, retire as master mixes do congelador. Deixe os tubos de master mix descongelar completamente. Em seguida, agite suavemente no vórtex para misturar.

7.3.2. Numa câmara de fluxo laminar ou câmara isolada, retire uma alíquota adequada de cada master mix para tubos individuais de microcentrifugadora limpos e estéreis.

- O volume das alíquotas é de 45 µl para cada reação.
- Acrescente uma reação adicional para cada 15 reações, para corrigir erros de pipetagem.
- Desta forma, para cada master mix (exceto Specimen Control Size Ladder), o número de reações (n) é:

n = 2 × n.º de amostras	(processe cada amostra em duplicado)
+ 1	ADN de controlo positivo (consultar a secção 7.7: <i>Controlos positivos recomendados</i>)
+ 1	ADN de controlo negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	controlo sem molde (água)
+ 1	para corrigir erros de pipetagem

n = 2 × n.º de amostras + 4 Total

- Portanto, o volume de alíquotas total para cada master mix = **n × 45 µl**.

- Para as master mix Specimen Control Size Ladder, o número de reações (**m**) é:

m = n.º de amostras	(processe cada amostra em duplicado)
+ 1	ADN de controlo positivo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	controlo sem molde (água)
+ 1	para corrigir erros de pipetagem

m = n.º de amostras + 3 Total

- Portanto, o volume de alíquota total para a master mix Specimen Control Size Ladder é = **m × 45 µl**.

7.3.3. Adicione 1,25 unidades (ou 0,25 µl a 5 U/µl) de polimerase do ADN Taq por reação a cada master mix.

- A polimerase do ADN Taq total adicionada a cada master mix = **n × 0,25 µl**, e **m × 0,25 µl** para a master mix do Specimen Control Size Ladder.
- Agite suavemente no vórtex para misturar.

7.3.4. Para cada reação, aliquote 45 µl da master mix adequada + solução de polimerase do ADN em poços individuais numa placa ou tubo de PCR.

7.3.5. Adicione 5 µl do molde adequado (ADN da amostra, ADN de controlo positivo, ADN de controlo negativo ou água) aos poços individuais que contêm as respetivas soluções de master mix.

- Pipete para cima e para baixo várias vezes para misturar.

7.3.6. Coloque a tampa ou cubra a placa de PCR.

- As amostras estão agora prontas para serem amplificadas num termociclador.
- Se a amplificação não puder ser realizada imediatamente depois da preparação dos reagentes, a placa ou os tubos de PCR podem ser armazenados entre 2°C e 8°C durante até 24 horas.

Guia Rápido:

Para cada master mix e n reações, misture:

n × 45 µl Master Mix
n × 0,25 µl polimerase do ADN Taq
 Agite suavemente no vórtex para misturar.
 Aliquote **45 µl** µl de master mix + solução de polimerase do ADN em cada poço de reação.
 ..
 Adicione **5 µl** de molde adequado a cada poço.
 Volume de reação total = **50 µl**

7.4. Amplificação

7.4.1. Amplifique as amostras utilizando o seguinte programa de PCR:

- Utilize a opção **calculada** para medição da temperatura com os termocicladores BioRad MJ Research PTC.

Tabela 5: Condições de termociclação

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
1	95°C	7 minutos	1
2	95°C	45 segundos	35
3	60°C	45 segundos	
4	72°C	90 segundos	
5	72°C	10 minutos	1
6	15°C	∞	1

7.4.2. Retire a placa de amplificação ou os tubos do termociclador.

- Embora o ADN amplificado permaneça estável à temperatura ambiente durante períodos de tempo prolongados, conserve os produtos de PCR entre 2°C e 8°C até à deteção.
- A deteção deve ser efetuada no espaço de 30 dias desde a amplificação.

7.5. Detecção por fluorescência ABI

É de salientar que, para a deteção por fluorescência ABI, é frequentemente observado um pico anterior, que é um artefacto devido ao método de deteção utilizado pelas plataformas ABI. Os picos anteriores são, por vezes, enviesados e possuem bases com inclinação no lado direito em direção ao pico real. Isto é particularmente evidente na master mix Specimen Control Size Ladder, onde o pico de 96 nucleótidos possui um pico anterior que surge aos 84 nucleótidos.

- Não efetue a multiplexação de produtos de PCR de master mixes diferentes, pois tal resulta numa sensibilidade geral reduzida do ensaio.

Plataformas ABI 310, 3100 ou 3130

- 7.5.1. Num novo tubo de microcentrifugadora, misture uma quantidade adequada (para um total de 10 µl por reação) de Hi-Di Formamide com ROX Size Standards. Agite bem no vórtex.
- 7.5.2. Numa nova placa de PCR com 96 poços, adicione 10 µl de Hi-Di Formamide com ROX size standards a poços individuais para cada reação.
- 7.5.3. Transfira 1 µl de cada reação para os poços que contêm Hi-Di Formamide com ROX size standards.
 - Adicione apenas uma amostra por poço.
 - Pipete para cima e para baixo para misturar.
- 7.5.4. Coloque a tampa ou cubra a placa ou tubos de PCR.
- 7.5.5. Proceda à desnaturação por calor das amostras a 95 °C durante 2 minutos e, em seguida, arrefeça rapidamente em gelo durante 5 minutos.
- 7.5.6. Prepare uma **folha de amostras** e uma **lista de injeção** para as amostras.
- 7.5.7. Processe as amostras num aparelho de eletroforese capilar ABI, de acordo com o manual do utilizador.
 - Os dados são automaticamente apresentados como picos com tamanho e cor específicos.
- 7.5.8. Examine o perfil e os controlos e comunique os resultados. (Consulte as secções 8: *Interpretação dos Resultados* e 10: *Valores esperados* a seguir).

Plataformas ABI 3500

Nota: Devido à variação do desempenho entre aparelhos da plataforma ABI 3500, a quantidade de formamida, amostra e padrão de tamanho apresentada no protocolo deve ser considerada como um ponto inicial. Poderá ser necessário otimizar o protocolo para plataformas ABI 3500 específicas.

- 7.5.9. Num novo tubo de microcentrifugadora, misture uma quantidade adequada (9,5 µl por reação) de Hi-Di Formamide com LIZ Size Standards. Agite bem no vórtex.
- 7.5.10. Numa nova placa de PCR com 96 poços, adicione 9,5 µl de Hi-Di Formamide com LIZ size standards a poços individuais para cada reação.
- 7.5.11. Transfira 0,5 µl de cada reação aos poços que contêm Hi-Di Formamide com LIZ size standards.
 - Adicione apenas uma amostra por poço.
 - Pipete para cima e para baixo para misturar.
- 7.5.12. Coloque a tampa ou cubra a placa de PCR.
- 7.5.13. Proceda à desnaturação por calor das amostras a 95 °C durante 3 minutos e, em seguida, arrefeça rapidamente em gelo durante 5 minutos.
- 7.5.14. Prepare uma folha de amostras e uma lista de injeção para as amostras.
- 7.5.15. Processe as amostras num aparelho de eletroforese capilar ABI 3500, de acordo com o respetivo manual do utilizador.
 - Os dados são automaticamente apresentados como picos com tamanho e cor específicos.
- 7.5.16. Examine o perfil e os controlos e comunique os resultados. (Consulte as secções 8: *Interpretação dos Resultados* e 10: *Valores esperados*).

7.6. Controlo de Qualidade

Os controlos positivos e negativos (ou normais) são fornecidos com o kit e podem ser processados em cópia única a cada vez que o ensaio é efetuado para garantir o desempenho adequado do mesmo. Além disso, incluir um controlo sem molde (*p. ex.*, água) para testar contaminação da master mix ou contaminação cruzada das reações de PCR devido a uma técnica de esterilização inadequada. Também pode ser adicionado um controlo tampão para garantir que não ocorreu contaminação do tampão utilizado para ressuspender as amostras. Os valores dos controlos positivos são facultados na secção *10.1 Tamanho esperado dos produtos amplificados*. Estão disponíveis controlos e controlos de sensibilidade adicionais (diluções de controlos positivos no nosso controlo negativo) na Invivoscribe.

7.7. Controlos positivos recomendados

Os tamanhos dos amplicons indicados foram determinados utilizando uma plataforma ABI. Os tamanhos dos amplicons registados no seu aparelho de eletroforese capilar específico pode diferir 1 a 4 nucleótidos (nt) em relação aos indicados, dependendo da plataforma de deteção e da versão do software de análise utilizado. Uma vez identificado, o tamanho do amplicon, conforme determinado na sua plataforma específica, será consistente de execução para execução. Esta reprodutibilidade é extremamente útil quando é monitorizada a recidiva de uma doença.

Nota: "Cor" indica a cor dos produtos gerada com a master mix quando é utilizada a atribuição de cor predefinida no sistema de deteção por fluorescência ABI.

Tabela 6. Controlos positivos recomendados

Master Mix	Alvo	Cor	ADN Controlo	Ref.º Catálogo	Tamanho do produto em nucleótidos (nt)
<i>IGH</i> Tube A	FR1-J _H	Azul	Intervalo de tamanho válido IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	310 - 360 280 ^a , 325
<i>IGH</i> Tube B	FR2-J _H	Azul	Intervalo de tamanho válido IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	250 - 295 260
<i>IGH</i> Tube C	FR3-J _H	Verde	Intervalo de tamanho válido IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40881090	100 - 170 145
<i>IGH</i> Tube D	D _H -J _H	Verde	Intervalo de tamanho válido IVS-0024 Clonal Control DNA	--- 40881390	110 - 290, 390 - 420 139
<i>IGH</i> Tube E	D _H 7-J _H	Azul	Intervalo de tamanho válido IVS-0008 Clonal Control DNA	--- 40880430	100 - 130^b 109
Specimen Control Size Ladder	Vários genes	Azul	Intervalo de tamanho válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602^c 96, 197, 297, 397, 602 ^c

^aNota: Também poderá estar presente um pico a 280 nt e este é um amplicon conhecido que está mesmo fora do limite de tamanho válido para o *IGH* Tube A.

^bNota: Um produto de PCR de 209 nt representa o mais pequeno pico de contexto derivado da região da linha germinativa D_H7-J_H1. Quando a amplificação por PCR é muito eficiente, também podem ser obtidos produtos mais longos por causa do annealing do primer a rearranjos génicos a jusante de J_H; *p. ex.*, 416 nt (D_H7-J_H2), 1028 nt (D_H7-J_H3), etc.

^cNota: Uma vez que os fragmentos de PCR mais pequenos são preferencialmente amplificados, não é invulgar que o fragmento de 602 nt apresente um sinal diminuído ou esteja totalmente em falta. Para a deteção por fluorescência ABI, o pico de 602 nt pode não aparecer durante os tempos de execução normais. Adicionalmente, o tamanho deste pico pode diferir em mais de 30 nt quando o tamanho do fragmento é extrapolado utilizando os tamanhos padrão GeneScan - 400HD [ROX] size standards.

8. Interpretação dos Resultados

Embora os resultados positivos sejam altamente sugestivos de malignidades, os resultados positivos e negativos devem ser interpretados tendo em consideração toda a informação clínica e os resultados dos exames laboratoriais. O intervalo do tamanho das master mixes foi determinado testando amostras de controlo positivo e negativo. Para uma interpretação precisa e útil, é importante ignorar picos que ocorram fora do intervalo de tamanho válido para cada uma das master mixes.

8.1. Análise

- 8.1.1. Comunique amostras que falhem a amplificação após a repetição do teste como "Não é possível comunicar um resultado para esta amostra porque o ADN era de qualidade ou quantidade insuficiente para análise".
- 8.1.2. O teste das amostras com resultados negativos deve ser repetido se a reação de controlo positivo falhar.
- 8.1.3. Repita o teste e/ou reavalie as amostras processadas em duplicado que apresentem resultados diferentes na alternância de amostras.
- 8.1.4. Todos os controlos do ensaio devem ser examinados antes de interpretar os resultados da amostra. Se os controlos não produzirem os resultados corretos, o ensaio não é válido e as amostras não podem ser interpretadas.

Tabela 7. A informação que se segue descreve a análise de cada um dos controlos e as decisões necessárias com base nos resultados.

Tipo de controlo	Resultado esperado	Resultado aberrante
Controlo Sem Molde	Nenhuma amplificação presente, prosseguir com a análise	Amplificação presente, repetir o ensaio.
Controlo policlonal	O tamanho do produto é consistente com o tamanho esperado indicado na secção <i>10.1 Tamanho esperado dos produtos amplificados</i> . Não estão presentes rearranjos clonais. Prosseguir com a análise.	Estão presentes rearranjos clonais. Repita o ensaio
Controlo positivo (também pode ser um controlo de extração se for retirado material de controlo positivo através do processo de extração)	O tamanho do produto é consistente com o tamanho esperado indicado na secção <i>10.1 Tamanho esperado dos produtos amplificados</i> . Prosseguir com a análise.	Repita o ensaio.
Specimen Control Size Ladder (este controlo da amplificação é <i>essencial</i> para amostras de quantidade e qualidade desconhecidas)	Se forem observados picos a 96, 197, 297, 397 e 602 nt, prossiga com a análise. Uma vez que os fragmentos de PCR mais pequenos são preferencialmente amplificados, não é invulgar que o fragmento de 602 nt apresente um sinal diminuído ou esteja totalmente em falta. Prosseguir com a análise.	Caso não sejam detetadas bandas, repita o ensaio, <u>a menos que a amostra seja positiva</u> . Se apenas estiverem visíveis 1, 2 ou 3 bandas, reavalie a amostra relativamente à degradação do ADN, <u>a menos que a amostra seja positiva</u> .

8.2. Interpretação da amostra

Dado que os controlos produzem resultados esperados, a interpretação das amostras clínicas deve ser efetuada conforme segue:

- Um ou dois picos positivos proeminentes^a dentro do intervalo de tamanho válido são assinalados como: **"Positivo para a deteção de rearranjo(s) do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas, consistente com a presença de uma população celular clonal. No contexto dos critérios de diagnóstico gerais, as populações de células clonais podem indicar a presença de malignidade hematológica"**.
- Uma ausência de picos positivos^a dentro do intervalo de tamanho válido é assinalada como: **"Negativo para a deteção de rearranjo(s) clonais do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas"**.

^aNota: Os critérios para definir um pico positivo são os seguintes:

- Os produtos gerados a partir de **amostras de diagnóstico** que se encontram dentro do intervalo de tamanho válido e que apresentam pelo menos três vezes a amplitude do terceiro maior pico no contexto policlonal são consistentes com um pico positivo.
- Os produtos gerados a partir de **amostras recolhidas depois do diagnóstico inicial** que se encontram dentro do intervalo de tamanho válido e que:
 - 1) apresentam pelo menos três vezes a amplitude do terceiro maior pico; **OU**
 - 2) ultrapassam a amplitude dos picos adjacentes e que são idênticos em tamanho aos produtos clonais do amplicon anteriormente gerados do mesmo doente utilizando-se a mesma master mix, são consistentes com um pico positivo.

9. Limitações do Procedimento

- Este ensaio não identifica 100% das populações de células clonais.
- Este ensaio não pode detetar com fiabilidade menos de uma célula positiva por um total de 100 células normais.
- Os resultados das análises de clonalidade molecular devem ser sempre interpretados no contexto de dados clínicos, histológicos e imunofenotípicos.
- Os ensaios baseados em PCR estão sujeitos a interferências por degradação do ADN ou a inibição da PCR devido a EDTA, heparina e outros agentes.

10. Valores esperados

10.1. Tamanho esperado dos produtos amplificados

Os tamanhos dos amplicons indicados foram determinados utilizando uma plataforma ABI. Os tamanhos dos amplicons registados em cada aparelho de eletroforese capilar específico podem diferir 1 a 4 nucleótidos (nt) em relação aos indicados, dependendo da plataforma de deteção e da versão do software de análise utilizado. Uma vez identificado, o tamanho do amplicon, conforme determinado em cada plataforma específica, será consistente de execução para execução. Esta reprodutibilidade é extremamente útil quando é monitorizada a recidiva de uma doença.

Nota: "Cor" indica a cor dos produtos gerada com a master mix quando é utilizada a atribuição de cor predefinida no sistema de deteção por fluorescência ABI.

Tabela 8. Tamanhos esperados dos produtos amplificados

Master Mix	Alvo	Cor	ADN Controlo	Ref. ^a Catálogo	Tamanho do produto em nt
<i>IGH</i> Tube A	FR1-J _H	Azul	Intervalo de tamanho válido	---	310 - 360
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	310 - 360
			IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	280 ^a , 325
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	345
			IVS-0024 Clonal Control DNA	40881390	342
<i>IGH</i> Tube B	FR2-J _H	Azul	Intervalo de tamanho válido	---	250 - 295
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	250 - 295
			IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	260
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	285
			IVS-0024 Clonal Control DNA	40881390	277
<i>IGH</i> Tube C	FR3-J _H	Verde	Intervalo de tamanho válido	---	100 - 170
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	100 - 170
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	145
<i>IGH</i> Tube D	D _H -J _H	Verde	Intervalo de tamanho válido	---	110 - 290, 390 - 420
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	235-258, 344 ^b
			IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	--- ^c
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	--- ^c
			IVS-0024 Clonal Control DNA	40881390	139
			IVS-0008 Clonal Control DNA	40880430	--- ^c
<i>IGH</i> Tube E	D _H 7-J _H	Azul	Intervalo de tamanho válido	---	100 - 130
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	209 ^d , 416 ^d
			IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	--- ^e
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	--- ^e
			IVS-0024 Clonal Control DNA	40881390	--- ^e
			IVS-0008 Clonal Control DNA	40880430	109
Specimen Control Size Ladder	Vários genes	Azul	Intervalo de tamanho válido	---	96, 197, 297, 397, 602^e
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	96, 197, 297, 397, 602 ^f

^aNota: Também poderá estar presente um pico a 280 nt e este é um amplicon conhecido que está mesmo fora do limite de tamanho válido para o *IGH* Tube A.

^bNota: Um pico não específico de 344 nt é o resultado do annealing cruzado do primer D_H2 a uma sequência na região da montante de J_H4. Na análise de fragmento, este pico não faz comigração com os produtos D-J.

^cNota: Picos não específicos de 74, 94, 158, 176, 187, 200 e 344 nt são vistos em várias diferentes linhagens celulares. Estas bandas estão ausentes na presença de contextos policlonais.

^dNota: Um produto de PCR de 209 nt representa o mais pequeno pico de contexto derivado da região da linha germinativa D_H7-J_H1. Quando a amplificação por PCR é muito eficiente, também podem ser obtidos produtos mais longos por causa do annealing do primer a rearranjos génicos a jusante de J_H; p. ex., 416 nt (D_H7-J_H2), 1028 nt (D_H7-J_H3), etc.

^eNota: Picos não específicos de 79 e 123 nt são vistos em várias diferentes linhagens celulares. Estas bandas estão ausentes na presença de contextos policlonais.

^fNota: Uma vez que os fragmentos de PCR mais pequenos são preferencialmente amplificados, não é invulgar que o fragmento de 602 nt apresente um sinal diminuído ou esteja totalmente em falta. Para a deteção por fluorescência ABI, o pico de 602 nt pode não aparecer durante os tempos de execução normais. Adicionalmente, o tamanho deste pico pode diferir em mais de 30 nt quando o tamanho do fragmento é extrapolado utilizando os tamanhos padrão GeneScan - 400HD [ROX] size standards.

10.2. Dados de Amostras

Os dados apresentados a seguir foram gerados utilizando-se as master mixes indicadas. Os produtos amplificados foram processados num aparelho ABI.

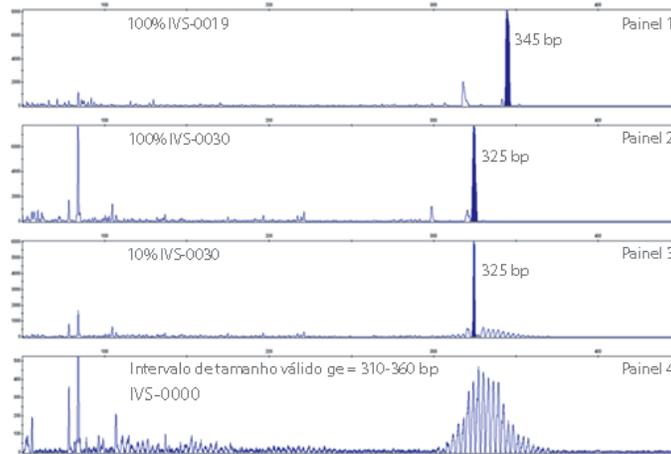


Figura 2. IGH Tube A

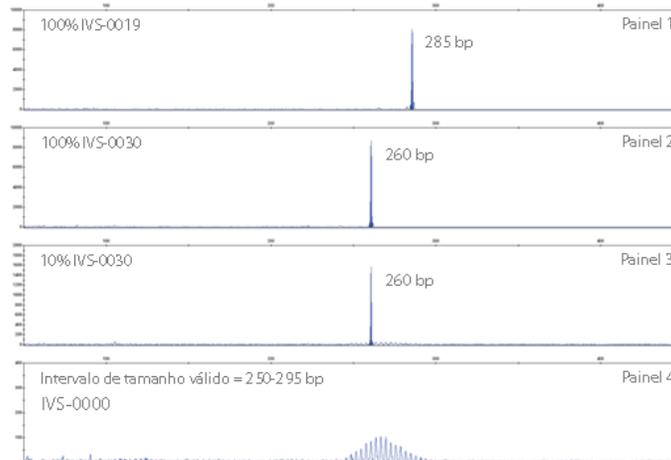


Figura 3. IGH Tube B

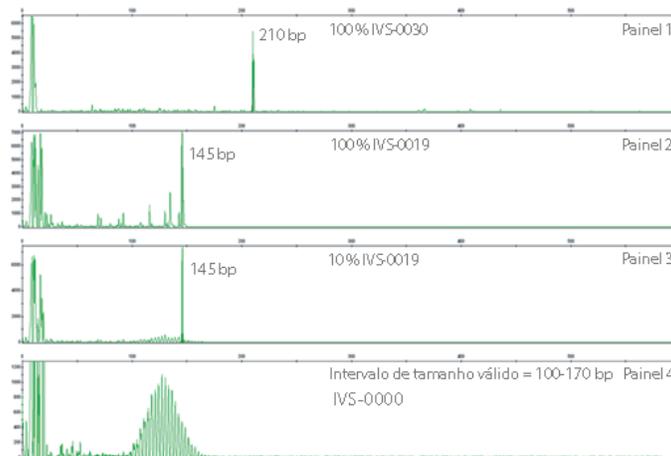


Figura 4. IGH Tube C

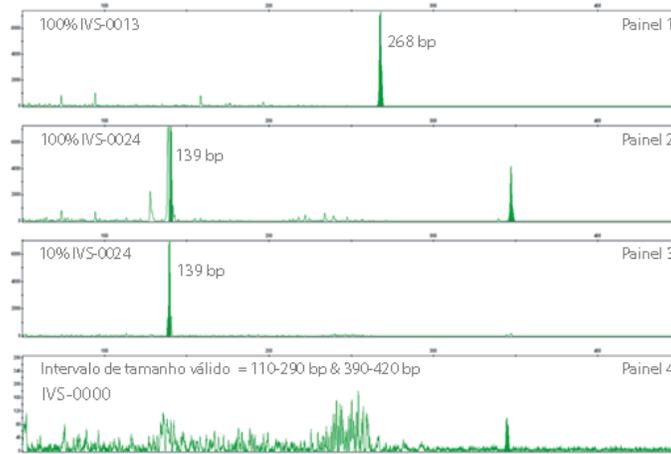


Figura 5. IGH Tube D

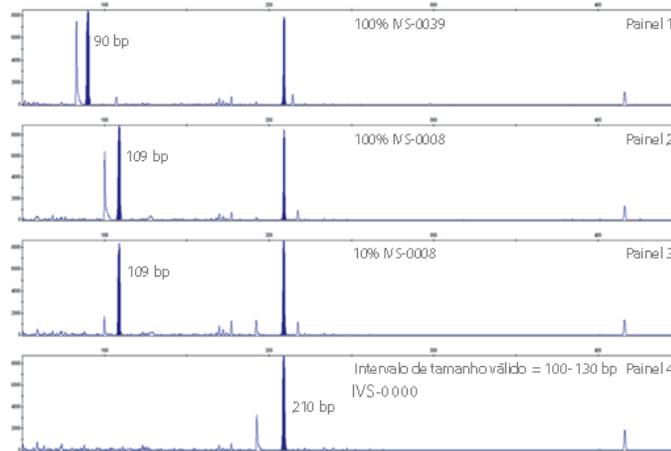


Figura 6. IGH Tube E

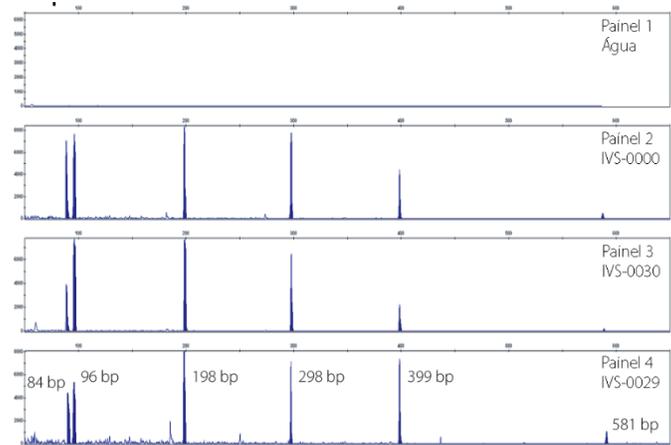


Figura 7. Master mix Specimen Control Size Ladder

11. Características de Desempenho

Este teste de PCR da IdentiClone *IGH* Gene Clonality é um procedimento rápido e fiável que é muito mais sensível do que a análise por Southern Blot (SB) para a deteção de clonalidade em casos de suspeita de linfoproliferações. O diagnóstico clínico e histopatológico final correlaciona-se bem com os resultados de PCR num número mais elevado de doentes em comparação com os resultados de SB, colocados em evidência em duas publicações notáveis mencionadas a seguir.^{2,3}

Tabela 9. Estudos de concordância

Concordância PCR/SB: ²		Concordância PCR/SB: ³	
<i>IGH</i> :	93% sensibilidade/92% especificidade	<i>IGH + IGK</i> :	85% sensibilidade
<i>IGK</i> :	90% sensibilidade/90% especificidade		
<i>IGL</i> :	86% sensibilidade/92% especificidade		
<i>TCRB</i> :	86% sensibilidade/98% especificidade	<i>TCRB</i> :	85% sensibilidade
<i>TCRG</i> :	89% sensibilidade/94% especificidade		
<i>TCRD</i> :	83% sensibilidade/95% especificidade		

Tabela 10. PCR x Análise de SB relativamente à histopatologia e ao diagnóstico final

	Concordância PCR/SB:	Sensibilidade PCR:	Sensibilidade SB:
<i>IGH + IGK</i> :	85%	98%	39%
<i>TCRB</i> :	85%	96%	35%

Um estudo independente realizado por Sandberg *et al.* incluiu 300 amostras de doentes com diversos tipos de amostras.³ Nos casos em que foram realizadas análises por PCR e SB e os resultados puderam ser correlacionados com a histopatologia e um diagnóstico final, a precisão diagnóstica de teste IdentiClone selecionados foi determinada em pelo menos 96%. Isto mostrou ser bem mais preciso do que a análise por SB, que neste estudo falhou em identificar 23 casos evidentes de malignidade e 7 prováveis malignidades. Não ocorreram resultados falsos positivos evidentes gerados pela utilização de testes IdentiClone e foi constatado um alto nível de precisão.³ Além disso, um claro benefício deste ensaio foi o de que os resultados clonais gerados permitiram a subsequente deteção de rearranjos génicos específicos do doente e do tumor para a deteção de doença residual mínima.

12. Bibliografia

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. (1999). An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Molecular Diagnostics* 4, 101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 17, 2257-2317.
3. Sandberg, Y, *et al.* (2005). BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J. Molecular Diagnostic* 7, 495-503.
4. van Krieken, JHJM *et al.* (2007). Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: – Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21, 201-206.

13. Assistência Técnica e Apoio ao Cliente

Os representantes de Assistência Técnica e Apoio ao Cliente estão disponíveis de segunda a sexta-feira para esclarecer dúvidas através de contacto telefónico, por e-mail ou no sítio Web.

Informações para Contacto



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | EUA

Telefone: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horário de funcionamento: 9:00 – 17:00 GMT - 8/GMT - 7

Serviços Técnicos: support@invivoscribe.com | Apoio ao Cliente: sales@invivoscribe.com | Website: www.invivoscribe.com

14. Símbolos

Os seguintes símbolos são atualmente utilizados na rotulagem dos produtos de diagnóstico da Invivoscribe.

	Referência do catálogo		Data de validade
	Volume de reagente		Representante autorizado na União Europeia
	Número de lote		Consulte as instruções de utilização
	Condições de armazenamento		Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Identificador de Dispositivo Exclusivo		Fabricante
	Conformidade do Reino Unido Avaliada		Pessoa responsável no Reino Unido
	Representante Autorizado Suíço		Conformidade Europeia

15. Aviso Legal

15.1. Garantia e Responsabilidade

A Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) está empenhada em fornecer produtos com a mais elevada qualidade. A Invivoscribe® garante que os produtos cumprem, ou excedem, os padrões de desempenho descritos nas Instruções de Utilização, tal como os produtos com este tipo de folhetos. Se um produto se encontrar abrangido pelas especificações do produto e o desempenho não corresponder ao especificado, a nossa política consiste em substituir o produto ou creditar o preço total de compra. A Invivoscribe® não oferece qualquer outro tipo de garantia, expressa ou implícita. A responsabilidade da Invivoscribe® não deverá exceder o preço de compra do produto. A Invivoscribe® não terá qualquer responsabilidade por danos diretos, indiretos, consequenciais ou incidentais decorrentes da utilização, resultados da utilização ou incapacidade de utilização dos seus produtos; deve ser estabelecida a eficácia do produto sob as condições controladas do comprador e no laboratório do comprador, as quais devem ser continuamente monitorizadas através de processos definidos e controlados pelo comprador, onde se devem incluir, entre outros, o teste de controlos positivos, negativos e em branco sempre que uma amostra é testada. O pedido, aceitação e utilização do produto representa a aceitação da exclusiva responsabilidade do comprador em assegurar a eficácia do produto e o acordo do comprador em relação à limitação da responsabilidade estipulada no presente parágrafo.

Este produto é um produto de diagnóstico *in vitro* e não se encontra disponível para venda ou utilização na América do Norte.

15.2. Patentes e Marcas Registadas

Este produto está abrangido por uma ou mais das seguintes: Patente Europeia N.º 1549764, Patente Europeia N.º 2418287, Patente Europeia N.º 2460889, Patente Japonesa N.º 4708029, Patente dos EUA 8859748 e aplicações pendentes e futuras. Todas estas patentes e aplicações estão licenciadas exclusivamente à Invivoscribe®. Patentes adicionais licenciadas à Invivoscribe que abrangem alguns destes produtos aplicam-se noutros locais. Muitos destes produtos podem exigir métodos de amplificação de ácidos nucleicos, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Nenhuma licença ao abrigo das referidas patentes para utilização de processos de amplificação ou enzimas é transmitida expressa ou implicitamente ao comprador mediante a compra deste produto.

Identiclon® é uma marca registada da Invivoscribe®.

©2023 Invivoscribe, Inc. Todos os direitos reservados. As marcas comerciais mencionadas neste documento são propriedade da Invivoscribe Technologies, Inc. e/ou das suas afiliadas, ou (relativamente às marcas registadas de terceiros utilizadas neste documento) dos seus respetivos proprietários.