IdentiClone®

Instruções de Utilização

IdentiClone® *IGH* + *IGK* B-Cell Clonality Assay

Para a identificação de rearranjos clonais do gene da cadeia pesada e da cadeia leve kappa de imunoglobulinas.

IVD Para utilização em diagnóstico *in vitro.*

invivoscribe

Condições de armazenamento: -85ºC a -65ºC

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

Ref. Catálogo	Produtos	Quantidade
REF 91000031	IdentiClone *IGH* + *IGK* B-Cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reações
REF 91000041	IdentiClone *IGH* + *IGK* B-Cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reações

Índice

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA 3
2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO ENSAIO 3
   2.1. Contextualização 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 5
4. REAGENTES 5
   4.1. Componentes dos Reagentes 5
   4.2. Advertências e Precauções 6
   4.3. Armazenamento 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 DE ENSAIO 9
   7.1. Materiais Fornecidos 9
   7.2. Materiais Necessários (não fornecidos) 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 17
12. BIBLIOGRAFIA 17
13. ASSISTÊNCIA TÉCNICA E APOIO AO CLIENTE 17
14. SÍMBOLOS 18
15. AVISO LEGAL 18
   15.1. Garantia e Responsabilidade 18
   15.2. Patentes e Marcas Registadas 18

1. Utilização Pretendida

O ensaio IdentiClone *IGH* + *IGK* B-Cell Clonality Assay é um produto para diagnóstico *in vitro* destinado à deteção baseada em PCR de rearranjos clonais do gene da cadeia pesada e da cadeia leve kappa de imunoglobulina em doentes com suspeita de linfoproliferações. Especificamente, o *IGH* + *IGK* B-Cell Clonality Assay pode ser utilizado para:

- Identificar a clonalidade em distúrbios linfoproliferativos atípicos
- Fornecer apoio ao diagnóstico diferencial entre lesões reativas e malignidades hematológicas[4]
- Atribuir uma linhagem presumível em distúrbios linfoproliferativos monoclonais maduros
- Identificar marcadores tumorais específicos (rearranjos de genes de *IGH* e *IGK*) para monitorização pós-tratamento
- Monitorizar e avaliar a recidiva da doença

2. Resumo e Explicação do Ensaio

2.1. Contextualização

Durante a ontogenia, ocorrem rearranjos de genes recetores de antigénios em linfócitos B e T. Este rearranjos genéticos 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 IdentiClone utiliza uma série de primers consenso do ADN direcionados para as regiões genéticas conservadas no interior dos genes da cadeia pesada e da cadeia leve kappa das imunoglobulinas. Este teste é utilizado para detetar a partir do ADN a grande maioria das malignidades clonais de linfócitos B. Os produtos do teste podem ser analisados através de diversos formatos de deteção, incluindo eletroforese em gel e eletroforese capilar.

Os ensaios IdentiClone da Invivoscribe representam uma nova abordagem quanto aos testes de clonalidade baseados em PCR. Estes ensaios padronizados foram cuidadosamente otimizados testando-se controlos positivos e negativos com as master mixes multiplex. O desenvolvimento do ensaio foi seguido por uma extensa validação, incluindo testes a mais de 400 amostras clínicas utilizando a Classificação Europeia-Americana de Linfomas Revista (REAL, Revised European-American Lymphoma Classification). Os testes foram realizados em mais de trinta proeminentes centros de análise independentes em toda a Europa, num estudo colaborativo denominado BIOMED-2 Concerted Action. Os resultados deste estudo BIOMED-2 indicam que os rearranjos de genes *IGH* e *IGK* poderão melhorar a fiabilidade e a sensibilidade dos testes.[2] Adicionalmente, testar ambos os rearranjos de genes *IGH* e *IGK* originou uma sensibilidade de 99%, comparativamente com 88% para *IGH* e 88% para *IGK* quando testados isoladamente, o que também poderá aumentar a fiabilidade dos testes, pois é mais provável que os produtos clonais sejam detetados em mais de um tubo.[4]

Os ensaios baseados em deteção ABI não conseguem detetar de forma fiável populações clonais que correspondam a menos de 1% da população total de linfócitos. Os resultados dos testes 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* Tubes A, B e C (IGH Tubos A, B e C) são direcionadas para as regiões framework 1, 2 e 3 (respetivamente) dentro das regiões variáveis e de junção do locus da cadeia pesada da imunoglobulina. A master mix *IGK* Tube A (IGK Tubo A) tem como alvo a região variável (V) e região de junção (J) do locus do gene da cadeia leve kappa da imunoglobulina. Enquanto a master mix *IGK* Tube B (IGK Tubo B) tem como alvo os rearranjos de elementos de deleção kappa (K_{de}) contendo a região variável (V) e a região intragénica Jκ-Cκ. Os rearranjos Vκ-K_{de} e Jκ-Cκ intrão-K_{de} resultantes são um produto de rearranjos falhados retidos pela célula B. Por último, a master mix Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular) tem como alvo vários genes e gera uma série de "amplicões" com 96, 197, 297, 397 e 602 nucleótidos (nt), de forma a garantir que a qualidade e a quantidade de ADN introduzida é adequada para produzir um resultado válido. Nos nossos ensaios Gene Clonality Assays, é utilizado um único programa de termociclador e metodologias de deteção semelhantes. 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 os primers (oligonucleótidos iniciadores) que têm como alvo a região framework conservada (FR) e a região de junção (J) (*IGH* Tubes A-C [IGH Tubos A-C]), a região variável (V) e a região de junção (J) (*IGK* Tube A [IGK Tubo A]), e as regiões variável (V), intrão Jκ-Cκ e K_{de} (*IGK* Tube B [IGK Tubo B]). Estas regiões conservadas encontram-se em ambos os lados de uma região V-J onde ocorrem rearranjos genéticos programados durante a maturação de todos os linfócitos B e T. Os genes de recetores de antigénios que sofrem rearranjos são os genes das cadeias pesadas e das 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. Portanto, 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, refletindo a população heterogénea de rearranjos V-J. O ADN de amostras que contêm uma população clonal produzem um ou dois produtos de amplificação (amplicões) proeminentes num contexto policlonal diminuído.

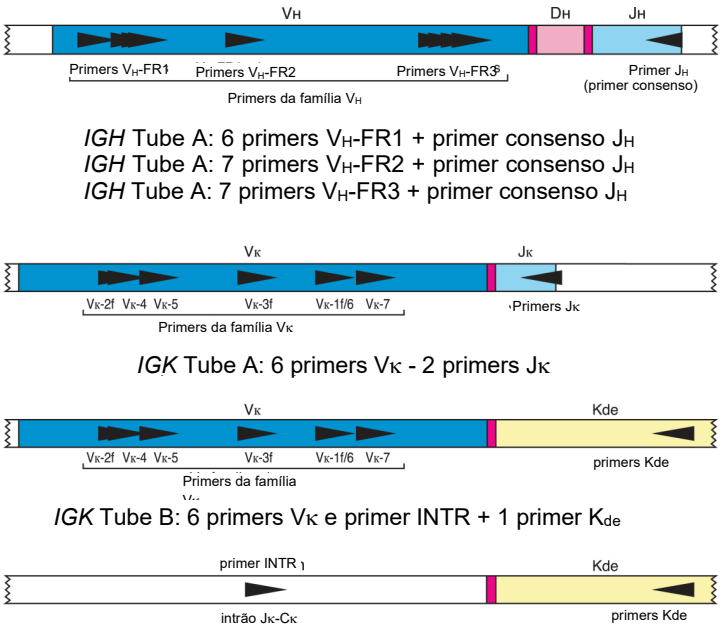

Figura 1. É ilustrada uma representação simples da organização de um gene de uma cadeia pesada de imunoglobulina *(IGH)* no cromossoma 14 e do gene da cadeia leve kappa de imunoglobulina no cromossoma 2p11.2. As setas pretas representam as posições relativas dos primers que têm como alvo os segmentos dos genes do framework conservado (FR1-3) e do consenso a jusante J_H para *IGH* e os primers Vκ, Jκ, INTR e K_{de} que são incluídos nos tubos de master mix *IGK*. 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 antigénios são polimórficos (consistindo numa população heterogénea de sequências de ADN relacionadas), é difícil empregar um único conjunto de sequências de primers 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 num conjunto de produtos de amplificação de vários tamanhos que geram uma distribuição Gaussiana em torno de um rearranjo estatisticamente favorecido. 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. Para os rearranjos do gene de *IGK*, o comprimento da região CDR3 é limitado e apresenta um desvio significativo (platicurtose). Assim, os produtos de PCR apresentam uma distribuição gaussiana muito estreita e são identificados de modo mais fácil e fiável mediante análise de cadeia dupla.

3.2. Deteção Diferencial por Fluorescência

A deteção diferencial por fluorescência é habitualmente utilizada para distinguir 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 poliacrilamida, bem como a utilização de agentes carcinogénicos, 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 intraensaio e interensaio 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: Ensaios disponíveis

Referência do catálogo	Descrição	Quantidade
REF 91000031	IdentiClone *IGH* + *IGK* B-Cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reações
REF 91000041	IdentiClone *IGH* + *IGK* B-Cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reações

Tabela 2. Componentes dos Kits

Reagente	Ref. Catálogo	Componentes dos Reagentes (ingredientes ativos)	Quantidade Unitária	91000031 Número de Unidades	91000041 Número de Unidades	Temp. de Conservação
Master Mixes	21010011CE	***IGH* Tube (tubo) 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	-85°C -65°C
	21010101CE	***IGH* Tube (tubo) 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	***IGH* Tube (tubo) 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	
	21020011CE	***IGK* Tube (tubo) A - 6FAM** Oligonucleótidos múltiplos direcionados para a região variável e região de junção do gene da cadeia leve kappa de imunoglobulina numa solução salina tamponada.	1500 µL	1	10	
	21020021CE	***IGK* Tube (tubo) B - 6FAM** Oligonucleótidos múltiplos direcionados para as regiões variável, intrão Jκ-Cκ e K_{de} do gene da cadeia leve kappa de imunoglobulina numa solução salina tamponada.	1500 µL	1	10	
Master Mix com controlo de amplificação com molde	20960021	**Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular) – 6FAM** Múltiplos oligonucleótidos direcionados para genes de manutenção.	1500 µL	1	10	
ADN de Controlo Positivo	40881750	**IVS-0030 Clonal Control DNA (ADN de controlo clonal)** 200 µg/mL de ADN em 1/10 de solução TE	100 µL	1	5	2°C-8°C ou -85°C-65°C
	40881090	**IVS-0019 Clonal Control DNA (ADN de controlo clonal)** 200 µg/mL de ADN em 1/10 de solução TE	100 µL	1	5	
	40880370	**IVS-0007 Clonal Control DNA (ADN de controlo clonal)** 200 µg/mL de ADN em 1/10 de solução TE	100 µL	1	5	
Negativo (Normal) ADN Controlo	40920010	**IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de controlo policlonal)** 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 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 quanto 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. Armazenamento 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 e, para armazenamento a longo prazo, 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. Aliquote 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: Thermal cycler (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: Deteção 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 capilares) (Analisador Genético ABI 3100 - 4 capilares)
    - ABI 3100 Genetic Analyzer (16 capilares) (Analisador Genético ABI 3100 - 16 capilares)
    - ABI 3130 Genetic Analyzer (4 capilares) (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 (Padrões de Matriz) adequadas, conforme descrito na secção *7.2: Materiais necessários (não fornecidos).*
- Utilize as predefinições para o seu tipo de polímero e capilar.
- Consulte a secção *7.5: Deteção por fluorescência ABI* para informações sobre a preparação da amostra.

6. Recolha e Preparação de Amostras

6.1. Precauções

As amostras biológicas de seres humanos podem conter materiais potencialmente infeciosos. 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 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 de Ensaio

7.1. Materiais Fornecidos

Tabela 3. Componentes dos Kits

Ref. Catálogo	Descrição
21010011CE	*IGH* Tube (tubo) A – 6FAM
21010101CE	*IGH* Tube (tubo) B – 6FAM
21010031CE	*IGH* Tube (tubo) C – HEX
21020011CE	*IGK* Tube (tubo) A – 6FAM
21020021CE	*IGK* Tube (tubo) B – 6FAM
20960021	Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular) – 6FAM
40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA (ADN de controlo clonal)
40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA (ADN de controlo clonal)
40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA (ADN de controlo clonal)
40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de controlo policlonal)

7.2. Materiais Necessários (não fornecidos)

Tabela 4. Materiais Necessários (não fornecidos)

Reagente/Material	Reagentes/Materiais e Fornecedores Recomendados	Ref. Catálogo	Notas
DNA Polymerase (ADN polimerase)	Roche: • DNA Polymerase (Polimerase do ADN) EagleTaq Invivoscribe, Inc • DNA Polymerase (Polimerase do ADN) FalconTaq 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	Estéril e sem DNase e RNase.
Pipetas calibradas	Rainin: • 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: • Veriti Dx Thermal Cycler (termociclador) Bio-Rad: • PTC-100 ou PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer • 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	Esterilizados
Pontas de pipeta com filtro	N/A	N/A	Esterilizadas, sem ARNase/ADNase/pirogénios
Tubos de microcentrifugadora	N/A	N/A	Esterilizados
Aparelho de Eletroforese Capilar ABI	Applied Biosystems: • ABI series (séries) 310, 3100 ou 3500	N/A	N/A
Hi-Di Formamide (formamida)	Applied Biosystems: • Hi-Di™ Formamide (formamida)	4311320	N/A
Tamanhos padrão	Invivoscribe: • Hi-Di Formamide (formamida) com tamanhos padrão rotulados com ROX para ABI 3100	60980061	N/A

Tabela 4. Materiais Necessários (não fornecidos)

Reagente/Material	Reagentes/Materiais e Fornecedores Recomendados	Ref. Catálogo	Notas
Tamanhos padrão	Applied Biosystems: • Para instruments (aparelhos) ABI 3100 ou 3130: o GeneScan™ - 400HD [ROX]™ • Para instruments (aparelhos) ABI 3500: o GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0	402985 4408399	N/A
Conjuntos de corantes de calibração espectral	Applied Biosystems: • Para instruments (aparelhos) ABI 3100 e 3130: o DS-30 Matrix Standard kit (kit padrão) (Dye Set D) (Conjunto de corante D) • Para instruments (aparelhos) ABI 310: o NED Matrix Standard (Padrão matriz) o e Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX] • Para instruments (aparelhos) ABI 3500: o DS-33 Matrix Standard Kit (kit padrão) (Dye Set G5) (Conjunto de corante G5)	4345827 402996 401546 4345833	N/A
Polímero	Applied Biosystems: • Polymer (polímero) POP-4™: o POP-4 para 310 Genetic Analyzers (analisadores genéticos) o POP-4 para 3100/3100-Avant Genetic Analyzers (analisadores genéticos) o POP-4 para 3130/3130xL Genetic Analyzers (analisadores genéticos) • Polymer (Polímero) POP-7™: o POP-7 para 3130/3130xL Genetic Analyzers (analisadores genéticos) o POP-7 para 3500/3500xL Genetic Analyzers (analisadores genéticos)	402838 4316355 4352755 4352759 4393714	N/A
Tampão	Applied Biosystems: • 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA (Tampão para analisador genético com EDTA)	402824	Diluir a 1:10 em água estéril antes da utilização

7.3. Preparação de Reagentes

- Todas as amostras podem ser testadas utilizando a master mix Specimen Control Size Ladder, de forma a 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.
- Teste 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 de modo a 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: Controlos Positivos Recomendados*)
+ 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 a master mix Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular), 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 U (ou 0,25 µL @ 5 U/µL) de Taq DNA Polymerase, por reação, a cada master mix.

- A Taq DNA polymerase total adicionada a cada master mix = **n × 0,25 µL** e **m × 0,25 µL** para a master mix do Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular).
- Agite suavemente no vórtex para misturar.

7.3.4. Para cada reação, aliquote 45 µL da master mix adequada + solução de polimerase de 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 Taq DNA

Agite suavemente no vórtex para misturar.

Aliquote **45 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 Termal cyclers (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. Deteção 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 (escala de tamanho molecular) onde o pico de 96 nucleótidos possui um pico anterior que surge aos 84 nucleótidos.

- Não efetue a multiplexação de produtos de PCR com 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 (formamida) com tamanho padrão rotulado com ROX. Agite bem no vórtex.

7.5.2. Numa placa de PCR com 96 poços, adicione 10 µL de Hi-Di Formamide (formamida) com tamanho padrão rotulado com ROX aos poços individuais, para cada reação.

7.5.3. Transfira 1 µL de cada reação para os poços que contêm Hi-Di Formamide (formamida) com tamanho padrão rotulado com ROX.

- 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 95ºC 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 equipamento 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 de Resultados* e 10: *Resultados Esperados* abaixo.)

Plataformas ABI 3500:

Nota: Devido à variação do desempenho entre aparelhos da plataforma ABI 3500, a quantidade de formamida, amostra e tamanho padrão descrita no protocolo deve ser considerada como um ponto de partida. 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 PCR) de Hi-Di Formamide com tamanho padrão rotulado com LIZ. Agite bem no vórtex.

7.5.10. Numa nova placa de PCR com 96 poços, adicione 9,5 µL de Hi-Di Formamide com tamanho padrão rotulado com LIZ a poços individuais para cada PCR.

7.5.11. Transfira 0,5 µL de cada PCR para os poços que contêm Hi-Di Formamide com tamanho padrão rotulado com LIZ.

- 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 95ºC 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 de Resultados* e 10: *Resultados Esperados* abaixo.)

7.6. Controlo de Qualidade

Os controlos positivos e negativos (ou normais) são fornecidos com o kit e serão processados em cópia única cada vez que o ensaio é efetuado, de modo a garantir o desempenho adequado do mesmo. Além disso, inclua um controlo sem molde (*p. ex.,* água) para testar contaminação da master mix ou contaminação cruzada dos testes 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 (diluições de controlos positivos num controlo negativo) na Invivoscribe.

7.7. Controlos Positivos Recomendados

Os tamanhos dos amplicões indicados foram determinados utilizando uma plataforma ABI. Os tamanhos dos amplicões registados no seu equipamento 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 amplicão, 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 nos sistemas de deteção por fluorescência ABI.

Tabela 6. Tamanhos previstos de Controlos Positivos Recomendados

Master Mix	Alvo	Cor	ADN Controlo	Ref. Catálogo	Tamanho do Produto em nucleótidos (nt)
IGH **Tube A**	FR1-J_H	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	**310 - 360** 280[a], 325
IGH **Tube B**	FR2-J_H	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	**250 - 295** 260
IGH **Tube C**	FR3-J_H	Verde	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40881090	**100 - 170** 145
IGK **Tube A**	Vκ-Jκ	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	**120 - 160, 190 - 210, 260 - 300** 143
IGK **Tube B**	Vκ-K_{de} + intrão-K_{de}	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	**210 - 250, 270 - 300, 350 - 390** 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Vários genes	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**96, 197, 297, 397, 602**[b] 96, 197, 297, 397, 602[b]

[a]Nota: Também poderá estar presente uma banda a 280 nt e esta é um amplicão conhecido que está mesmo fora do limite de tamanho válido para o *IGH* Tube A.
[b]Nota: 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.

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 de tamanho para cada master mix 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. Repita o teste das amostras com resultados negativos se a reação de controlo positivo falhar.

8.1.3. Se as amostras processadas em duplicado produzirem resultados diferentes, repita o teste e/ou reavalie as amostras para troca 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 *10.1*: *Tamanho esperado dos produtos amplificados*. 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 *10.1*: *Tamanho esperado dos produtos amplificados*. Prosseguir com a análise.	Repetir o ensaio
Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular) (este controlo da amplificação é essencial para amostras de quantidade e qualidade desconhecidas)	Se forem observados picos a 99, 199, 299, 399 e 602 nt, prosseguir 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, repetir o ensaio, a menos que a amostra seja positiva. Se apenas estiverem visíveis 1, 2 ou 3 bandas, reavalie a amostra relativamente à degradação do ADN, a menos que a amostra seja positiva.

8.2. Interpretação da amostra

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

- Uma ou duas bandas positivas proeminentes[a] dentro do intervalo de tamanho válido são assinaladas como:

"**Positivo para a deteção de rearranjo(s) do gene da cadeia pesada ou cadeia leve kappa da imunoglobulina, consistente com a presença de uma população de células clonais. No contexto dos critérios de diagnóstico gerais, as populações de células clonais podem indicar a presença de malignidade hematológica**."

- Uma ausência de bandas positivas[a] dentro do intervalo de tamanho válido é assinalada como:

"**Negativo para a deteção de rearranjo(s) clonais do gene da cadeia pesada ou cadeia leve kappa de imunoglobulina.**"

[a]Nota: **Os critérios para definir uma banda positiva são os seguintes:**

- Os produtos gerados a partir de amostras 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 uma banda positiva.
- 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 de amplificação 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 (1) célula positiva por 100 células normais.
- Os resultados dos testes 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 amplicões indicados foram determinados utilizando uma plataforma ABI. Os tamanhos dos amplicões registados no seu equipamento 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 amplicão, 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 nos sistemas de deteção por fluorescência ABI.

Tabela 8. Tamanhos esperados dos produtos amplificados

Master Mix	Alvo	Cor	ADN Controlo	Ref. Catálogo	Tamanho do produto em nt
***IGH* Tube A**	FR1-J_H	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090	**310 - 360** 310 - 360 280[a], 325 345
***IGH* Tube B**	FR2-J_H	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090	**250 - 295** 250 - 295 260 285
***IGH* Tube C**	FR3-J_H	Verde	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090	**100 - 170** 100 - 170 --- 145
***IGK* Tube A**	Vκ-Jκ	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	**120 - 160, 190 - 210, 260 - 300** 135 - 155 143
***IGK* Tube B**	Vκ-K_{de} + intrão-K_{de}	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	**210 - 250, 270 - 300, 350 - 390** 225 - 245, 265 - 285, 404[b,c] 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Vários genes	Azul	**Intervalo de Tamanho Válido** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**96, 197, 297, 397, 602[d]** 96, 197, 297, 397, 602[d]

[a]Nota: Também poderá estar presente uma banda a 280 nt e esta é um amplicão conhecido que está mesmo fora do limite de tamanho válido para o *IGH* Tube (tubo) A.

[b]Nota: A distribuição normal para os rearranjos do gene *IGK* está muito truncada devido à limitada diversidade de junção. Por favor, consulte o artigo Rock *et al.* para uma explicação mais detalhada.[5]

[c]Nota: Em condições subótimas, pode ser detetado um produto não específico de 404 nt no Tube (tubo) B. Para distinguir entre específico e não específico, um controlo negativo de ADN não deverá apresentar esta banda na mesma experiência. Se uma banda estiver presente, consideramos a banda como não específica.

[d]Nota: 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.

10.2. Dados de Amostras

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

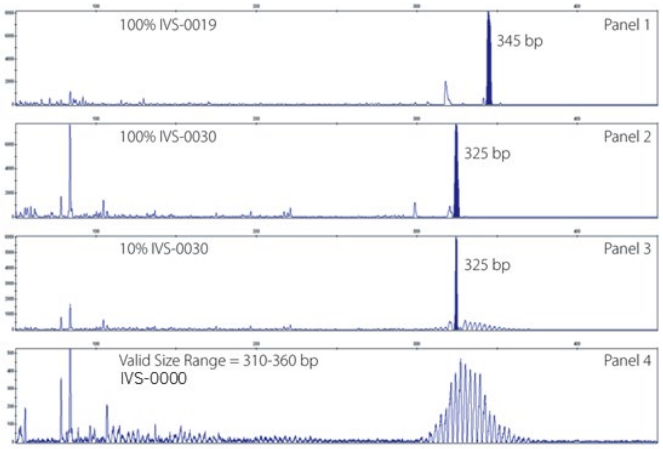

Figura 2. *IGH* Tube A

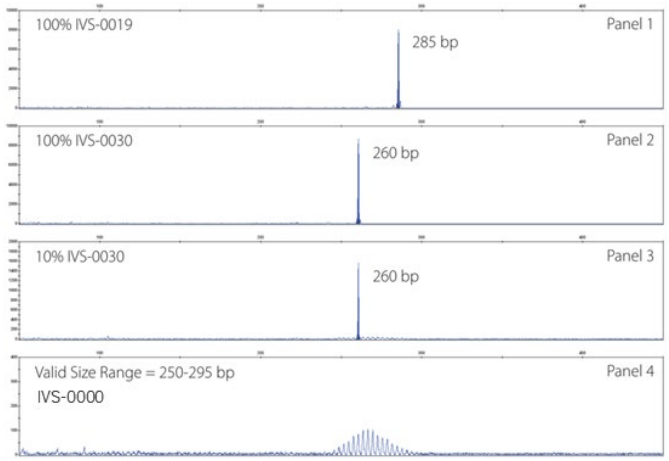

Figura 3. *IGH* Tube B

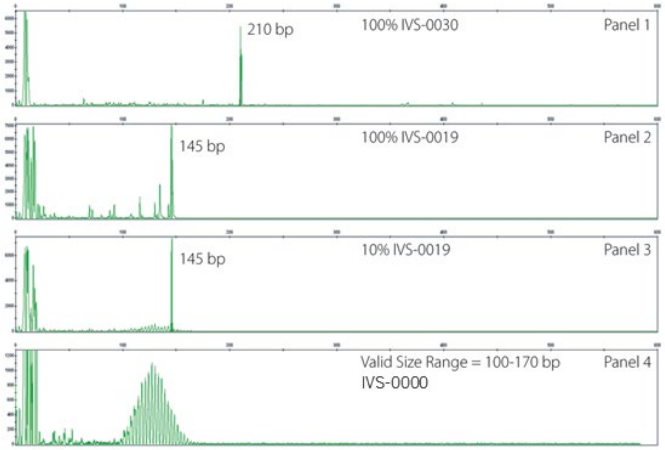

Figura 4. *IGH* Tube C

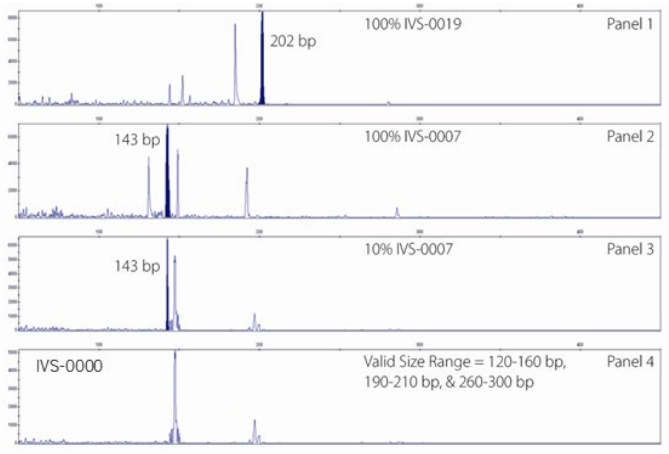

Figura 5. *IGK* Tube A

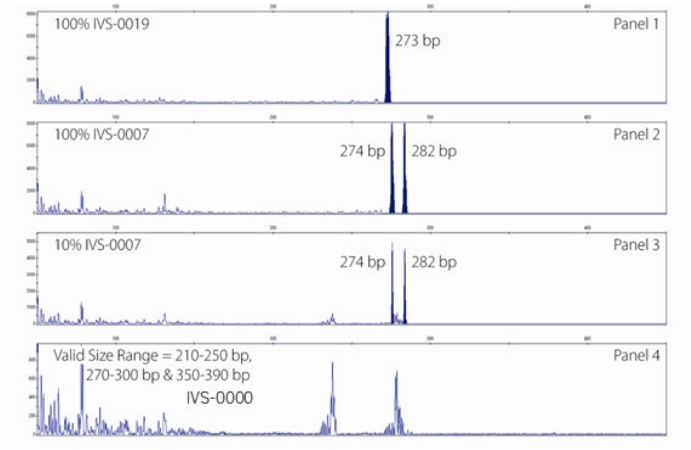

Figura 6. *IGK* Tube B

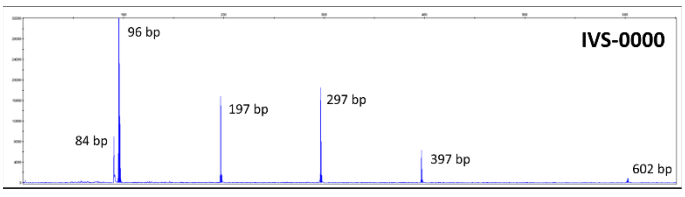

Figura 7. Para a master mix Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular)

11. Características de Desempenho

Este teste de PCR da IdentiClone *IGH* + *IGK* B-Cell 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.[2,3]

Tabela 9. Estudos de Concordância

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

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

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

Um estudo independente conduzido 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 testes 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 sete 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). Miller, JE, et al., 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.
5. Rock, EP, Sibbald, PR, Davis, MM, Chein, YH. (1994). CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med*., 179, 323-328.

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 website.

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.

REF	Referência do catálogo		Data de validade
VOL	Volume de reagente	EC REP	Representante autorizado na União Europeia
LOT	Número de lote		Consulte as instruções de utilização
	Condições de armazenamento	IVD	Para utilização em diagnóstico *in vitro*
UDI	Identificador de Dispositivo Exclusivo		Fabricante
UK CA	Conformidade do Reino Unido Avaliada	UKRP	Pessoa responsável no Reino Unido
CH REP	Representante Autorizado Suíço	CE	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 outras, 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 as 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.

Identiclone® é uma marca registada da Invivoscribe®.

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