

Instruções de Utilização

CE UK
CA IVD

IdentiClone® *TCRB* Gene Clonality Assay

Para a identificação de rearranjos clonais de genes da cadeia beta do recetor de células T.

IVD Para utilização em diagnóstico *in vitro*



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

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

Ref.ª Catálogo	Produto	Quantidade
REF 92050011	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reações
REF 92050021	IdentiClone <i>TCRB</i> 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. Detecção Diferencial por Fluorescência	4
4. REAGENTES	5
4.1. Componentes dos Reagentes	5
4.2. Avisos e Precauções	6
4.3. Conservação e Manuseamento	6
5. EQUIPAMENTOS	7
5.1. Termociclador	7
5.2. Equipamentos 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. Componentes dos Reagentes	9
7.2. Materiais Necessários, mas não incluídos	9
7.3. Preparação de Reagentes	10
7.4. Amplificação	11
7.5. Detecção por Fluorescência ABI	12
7.6. Controlo de Qualidade	12
7.7. Controlos Positivos Recomendados	13
8. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	13
8.1. Análise	13
8.2. Interpretação da Amostra	14
9. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	14
10. VALORES ESPERADOS	15
10.1. Tamanho Esperado dos Produtos Amplificados	15
10.2. Dados de Amostras	15
11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	17
12. ASSISTÊNCIA TÉCNICA E APOIO AO CLIENTE	17
13. BIBLIOGRAFIA	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 IdentiClone *TCRB* Gene Clonality Assay é um produto de diagnóstico in vitro destinado à detecção baseada em PCR de rearranjos clonais de genes da cadeia beta do recetor de células T em doentes com suspeita de linfoproliferações. Especificamente, o *TCRB* Gene Clonality Assay pode ser utilizado para:

- Identificar clonalidade em casos de suspeita de linfoproliferações
- Fornecer apoio ao diagnóstico diferencial entre lesões reativas e malignidades de células T e algumas malignidades de células B imaturas
- Determinar o envolvimento de linhagem em perturbações linfoproliferativas maduras
- 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. Estes 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 génicos V-J únicos presentes nestes loci de recetores de antigénios.¹ Este ensaio de PCR IdentiClone utiliza uma série de primers consenso de ADN direcionados para as regiões genéticas conservadas no gene da cadeia beta do recetor de células T. Este ensaio é utilizado para detetar, a partir do ADN, a grande maioria das malignidades clonais de células T. Os produtos do ensaio podem ser analisados através de diversas técnicas de detecção, incluindo eletroforese em gel e eletroforese capilar.

A análise de rearranjos genéticos pode ainda ser realizada através de técnicas baseadas em Southern Blot (SB). Apesar da análise por SB ser muito fiável, é cada vez mais substituída por técnicas de PCR devido à sua maior eficácia e sensibilidade. Além disso, a técnica de PCR é relativamente fácil, menos trabalhosa e requer quantidades muito menores de ADN de elevado peso molecular do que as análises de SB. Adicionalmente, a técnica de PCR pode geralmente ser realizada em ADN isolado a partir de tecidos impregnados em parafina, ao passo que o SB não pode ser realizado neste tipo de amostras por o ADN estar frequentemente degradado. Portanto, existe uma forte necessidade de substituir a análise baseada em SB por técnicas de PCR mais fiáveis.

2.2. Resumo

Os ensaios IdentiClone da Invivoscribe representam uma nova abordagem quanto aos ensaios 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 e utilizando a Classificação Europeia-Americana de Linfomas Revista (REAL, Revised European-American Lymphoma Classification). Os testes foram realizados em mais de trinta centros de análise independentes proeminentes 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 correspondam a 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.

Este kit de testes inclui quatro (4) master mixes. Os *TCRB* Tube A e Tube B (Tubo *TCRB* A e Tubo *TCRB* B) têm como alvo as regiões framework dentro da região variável e a região de junção do locus da cadeia beta do *TCR*. O *TCRB* Tube C (Tubo *TCRB* C) tem como alvo a região de diversidade e a região de junção. Por último, a master mix escala de tamanho molecular tem como alvo vários genes e gera uma série de amplicões com 96, 197, 297, 397 e 602 pares de bases, de forma a garantir que a qualidade e a quantidade de ADN introduzida é adequada para produzir um resultado válido. Nos nossos ensaios de clonalidade génica, é utilizado um único programa de termociclador e metodologias de detecção semelhantes. Isto melhora a consistência e facilita a formação cruzada 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 T. Estes testes amplificam o ADN entre primers que têm como alvo as regiões variáveis (V) conservadas e as regiões de junção (J) conservadas (*TCRB* Tubes A e B (Tubos *TCRB* A e B)), bem com as regiões de diversidade (D) e de junção (*TCRB* Tube C (Tubo *TCRB* C)). 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 são as cadeias pesadas e as cadeias leves das imunoglobulinas nas células B, e os genes do recetor de células T nas células T. Cada célula B e célula 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. Num gel, esta distribuição de produtos é visualizada como um "arrastamento" (smear). A distribuição gaussiana reflete a população heterogénea de rearranjos V-J. (Em determinados casos, quando não está presente ADN de linfócitos, não é observado nenhum produto.) Para o ADN de amostras que contêm uma população clonal, são gerados um ou dois produtos de amplificação (amplicões) proeminentes num contexto policlonal diminuído.



Figura 1. Este é um diagrama simplificado de um rearranjo representativo do gene da cadeia gama do recetor de células T no cromossoma 7 (7q35), no qual é indicada a posição aproximada dos primers de ADN a montante e a jusante. Os números dos primers e a sua especificidade são listados para as master mixes nos Tubos A, B e C.

Tubo A: 23 primers $V\beta$ + 6 primers $J\beta 1$ e 3 primers $J\beta 2$

Tubo B: 23 primers $V\beta$ + 4 primers $J\beta 2$

Tubo C: 2 primers $D\beta$ + 13 primers $J\beta$



Uma vez que os genes dos recetores de antígenos são polimórficos (consistindo numa população heterogénea de sequências de ADN relacionadas), é difícil utilizar um único conjunto de sequências de primers de ADN que tenha como alvo todas as regiões conservadas que flanqueiam o 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 diferentes tamanhos que forma uma distribuição gaussiana em torno de um rearranjo de tamanho médio, estatisticamente favorecido.

3.2. Detecção Diferencial por Fluorescência

A deteção diferencial por fluorescência é habitualmente utilizada para distinguir os produtos de amplificação de diferentes tamanhos, utilizando um equipamento 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 equipamento 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 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 os primers e o arquivamento automático dos dados. A reprodutibilidade intraensaio e interensaio na determinação do tamanho utilizando eletroforese capilar é de aproximadamente 1 a 2 pares de bases. Esta reprodutibilidade e sensibilidade associadas ao arquivamento automático dos dados da amostra permitem a monitorização, rastreio e comparação de dados de doentes individuais ao longo do tempo.

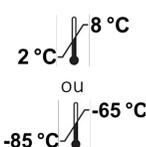
4. Reagentes

4.1. Componentes dos Reagentes

Tabela 1. Kits Disponíveis

Ref.ª Catálogo	Nome do Produto	Quantidade
 92050011	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reações
 92050021	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reações

Tabela 2. Componentes dos Reagentes

Reagente	Ref.ª Catálogo	Componentes dos Reagentes (ingredientes ativos)	Quantidade Unitária	92050011 Número de Unidades	92050021 Número de Unidades	Temp. de Conservação
Master Mixes	22050011CE	<i>TCRB</i> Tube A – 6FAM & HEX Múltiplos oligonucleótidos direcionados para as regiões V β + J β 1 + J β 2 do gene da cadeia beta do recetor de células T numa solução salina tamponada.	1500 μ l	1	10	
	22050021CE	<i>TCRB</i> Tube B – 6FAM Múltiplos oligonucleótidos direcionados para as regiões V β + J β 2 do gene da cadeia beta do recetor de células T numa solução salina tamponada.	1500 μ l	1	10	
	22050031CE	<i>TCRB</i> Tube C – 6FAM & HEX Múltiplos oligonucleótidos direcionados para as regiões D β + J β 1 + J β 2 do gene da cadeia beta do recetor de células T numa solução salina tamponada.	1500 μ l	1	10	
Master Mix com controlo de amplificação com molde	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Múltiplos oligonucleótidos dirigidos para genes de manutenção.	1500 μ l	1	10	
ADN de Controlo Positivo	40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA 200 μ g/ml de ADN em 1/10 de solução TE	100 μ l	1	5	
	40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA 200 μ g/ml de ADN em 1/10 de solução TE	100 μ l	1	5	
	40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA 200 μ g/ml de ADN em 1/10 de solução TE	100 μ l	1	5	
Negativo (Normal) ADN de Controlo	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 μ g/ml de ADN em 1/10 de solução TE	100 μ l	1	5	

Nota: Não são utilizados conservantes no fabrico deste kit.

4.2. Avisos e Precauções

- **IVD** Este produto destina-se a diagnóstico *in vitro*.
- O kit de ensaio deve ser utilizado como um sistema. Não substitua os reagentes com os de outro fabricante. A diluição, redução dos volumes de reações de amplificação ou outros desvios deste protocolo podem afetar o desempenho deste ensaio e/ou anular qualquer sublicença limitada que acompanha a compra deste kit de ensaio.
- 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 que é usado o programa correto do termociclador, uma vez que outros programas poderão fornecer dados imprecisos/erróneos, tais como resultados de falsos positivos e falsos negativos.
- Não misture nem combine reagentes de kits com diferentes números de lote.
- O pessoal de laboratório deve usar equipamento de proteção individual adequado e seguir 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 na preparação do ADN da 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 monitorizados 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 entre as áreas de trabalho separadas: 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 DE ENSAIO ENTRE -85°C E -65°C**.
- A temperatura de conservação ótima para os controlos de ADN é entre 2°C a 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. Aliquote as master mixes em tubos com tampa roscada e O-ring estéreis, se necessário.

5. Equipamentos

5.1. Termociclador

- Utilização ou função: Amplificação de amostras de ADN
- Equipamento 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. Equipamentos de Eletroforese Capilar ABI

- Utilização ou função: Detecção e análise de fragmentos
- Os equipamentos 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 equipamento ABI utilizado deve ser calibrado com as Matrix Standards adequadas, conforme descrito na secção 7.2 *Materiais necessários, mas não fornecidos*.
- 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 expedido à temperatura ambiente)
- Cubo de tecido com pelo menos 5 mm (armazenado e expedido congelado ou armazenado e expedido em RPMI 1640 à temperatura ambiente ou em gelo)
- 2 µg de ADN genómico (armazenado entre 2°C e 8°C e expedido à temperatura ambiente)
- Tecido fixado em formalina e impregnado em parafina ou lâminas (armazenados e expedidos 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. Componentes dos Reagentes

Tabela 3. Materiais Incluídos

Ref.º Catálogo	Descrição
22050011CE	TCRB Tube A – 6FAM
22050021CE	TCRB Tube B – 6FAM
22050031CE	TCRB Tube C - 6FAM & HEX
20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA
40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA
40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA
40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA

7.2. Materiais Necessários, mas não incluídos

Tabela 4. Materiais Necessários, mas não incluídos

Reagente/Material	Reagentes/Materiais e Fornecedores Recomendados	Ref.º Catálogo	Notas
Polimerase do ADN	Roche: <ul style="list-style-type: none"> DNA Polymerase (Polimerase de ADN) EagleTaq 	05206944190	N/A
	Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> DNA Polymerase (Polimerase de ADN) FalconTaq ou equivalente 	60970130	
Água destilada em recipiente de vidro, desionizada e com qualidade para biologia molecular ou USP	N/A	N/A	Sem ADNase/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 (termociclador) 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
Equipamento de Eletroforese Capilar ABI	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Série ABI 310, 3100 ou 3500 	N/A	N/A
Formamida (Formamida) Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Formamide (Formamida) Hi-Di™ 	4311320	N/A
Tamanhos Padrão	Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> Formamide (Formamida) Hi-Di com tamanhos padrão rotulados com ROX para ABI 3100 	60980061	N/A
	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Para instrumentos (equipamentos) ABI 3100 ou 3130: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ - 400HD [ROX]™ 	402985	
	<ul style="list-style-type: none"> Para ABI 3500 instruments (equipamentos): <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ - 600 [LIZ]™ v2.0 	4408399	

Tabela 4. Materiais Necessários, mas não incluídos

Reagente/Material	Reagentes/Materiais e Fornecedores Recomendados	Ref.º Catálogo	Notas
Conjuntos de Corantes de Calibração Espectral	Thermo Fisher Scientific:		
	• Para instrumentos (equipamentos) ABI 3100 e 3130: ○ DS-30 Matrix Standard kit (Dye Set D)	4345827	
	• Para ABI 310 instrumentos (equipamentos): ○ NED Matrix Standard ○ e Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX]	402996 401546	N/A
	• Para instrumentos (equipamentos) ABI 3500: ○ DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)	4345833	
Polímero	Thermo Fisher Scientific:		
	• Polymer (polímero) POP-4™: ○ POP-4 para 310 Genetic Analyzers ○ POP-4 para 3100/3100-Avant Genetic Analyzers ○ POP-4 para 3130/3130xL Genetic Analyzers	402838 4316355 4352755	N/A
	• Polymer (polímero) POP-7™: ○ POP-7 para 3130/3130xL Genetic Analyzers ○ POP-7 para 3500/3500xL Genetic Analyzers	4352759 4393714	
Tampão	Thermo Fisher Scientific: • Tampão 10X com EDTA para Genetic Analyzer	402824	Diluir a 1:10 em água estéril antes da utilização.

7.3. Preparação de Reagentes

- A análise de amostras desconhecidas utilizando a master mix Specimen Control Size Ladder pode garantir que não estão presentes inibidores de amplificação e que existe ADN com qualidade e quantidade suficientes para gerar um resultado válido.
- Os resultados de ensaios únicos são válidos. No entanto, recomenda-se a realização de ensaios em duplicado quando possível. Se os ensaios em duplicado originarem resultados inconsistentes, é necessário repetir o ensaio e re-avaliar a amostra.
- Testar controlos de ensaio positivo, negativo 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.

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 x n.º de amostras	(processe cada amostra em duplicado)
	+ 1	ADN de controlo positivo (consultar a Tabela 6)
	+ 1	ADN de controlo negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
	+ 1	controlo sem molde (água)
	+ 1	para corrigir erros de pipetagem

n = 2 x n.º de amostras + 4 Total

- Portanto, o volume de alíquotas total para cada master mix é **n x 45 µl**.
- Para a master mix Specimen Control Size Ladder, o número de reações (**m**) é:

m =	n.º de amostras	(processe cada amostra uma vez)
	+ 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 total de alíquotas para a master mix Specimen Control Size Ladder é **m x 45 µl**.

- 7.3.3. **Para o *TCRB* Tube A e *TCRB* Tube B:** Adicione 2,25 U (ou 0,45 µl @5 U/µl) de Polimerase de ADN Taq por reação a cada master mix.
- O total de Polimerase de ADN Taq adicionado a cada master mix é **n × 0,45 µl**.
 - Agite suavemente no vórtex para misturar.
- 7.3.4. **Para o *TCRB* Tube C e Specimen Control Size Ladder:** Adicione 1,25 U (ou 0,25 µl @5 U/µl) de Polimerase de ADN Taq por reação.
- O total de Polimerase de ADN Taq adicionado a cada master mix é **n × 0,25 µl** para a master mix *TCRB* Tube C e **m × 0,25 µl** para a master mix Specimen Control Size Ladder.
 - Agite suavemente no vórtex para misturar.
- 7.3.5. Para cada reação, aliquote 45 µl da master mix adequada + solução de polimerase do ADN em poços individuais numa placa ou tubo de PCR.
- 7.3.6. 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.
- 7.3.7. Coloque a tampa ou cubra a placa de PCR.
- As amostras estão agora prontas para serem amplificadas num termociclador.
- 7.3.8. Se a amplificação não puder ser realizada imediatamente após a preparação dos reagentes, a placa ou os tubos de PCR podem ser armazenados entre 2°C e 8°C durante um máximo de 24 horas.

Guia Rápido

Para cada master mix e n reações, misture:

n × 45 µl	Master Mix
n × 0,25 µl ou 0,45 µl*	Polimerase de ADN Taq

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

***Nota:** Use 0,45 µl de Polimerase do ADN Taq para o *TCRB* Tube A e *TCRB* Tube B e 0,25 µl de Polimerase do ADN Taq para o *TCRB* Tube C e Specimen Control Size Ladder.

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 ou os tubos de amplificação do termociclador.
- 7.4.3. 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

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.^a Misture 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 equipamento de eletroforese capilar ABI, de acordo com o manual do utilizador.
- 7.5.8. Reveja o perfil e controlos, comunique os resultados (consulte as secções 8 *Interpretação dos Resultados* e 10 *Valores Esperados*).
 - Os dados são automaticamente apresentados como picos com tamanho e cor específicos.

Plataformas ABI 3500:

Nota: Devido à variação do desempenho entre equipamentos 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 reação) de Hi-Di Formamide com LIZ Size Standards.^a Misture 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 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 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 equipamento de eletroforese capilar ABI 3500, de acordo com o respetivo manual do utilizador.
- 7.5.16. Os dados são automaticamente apresentados como picos com tamanho e cor específicos. Examine o perfil e os controlos e comunique os resultados (consulte as secções 8 *Interpretação dos Resultados* e 10 *Valores Esperados*).

^a**Nota:** Consulte o folheto informativo do produto da Applied Biosystems para informações sobre como misturar Hi-Di Formamide com tamanhos padrão para diferentes equipamentos ABI.

7.6. Controlo de Qualidade

Os controlos positivos e negativos (ou normais) são fornecidos com o kit e podem ser 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 das reações 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 para os controlos positivos são indicados na Tabela 6. Estão disponíveis controlos adicionais e controlos de sensibilidade (diluições de controlos positivos no nosso 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 em cada equipamento de eletroforese capilar podem diferir 1 a 4 pares de bases 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 gerados com a master mix quando é utilizada a atribuição de cor predefinida nos sistemas de deteção por fluorescência ABI.

Tabela 6. Controlos Positivos Recomendados

Master Mix	Alvo	Cor	ADN de Controlo	Ref.ª Catálogo	Tamanho do produto (pares de bases)
<i>TCRB</i> Tube A	Vβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	Intervalo de Tamanho Válido IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	240 - 285 264
<i>TCRB</i> Tube B	Vβ + Jβ2	Azul (Jβ2.X)	Intervalo de Tamanho Válido IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40880190 40881210	240 - 285 253 267
<i>TCRB</i> Tube C	Dβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	Intervalo de Tamanho Válido IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1) 309
Specimen Control Size Ladder	Múltiplos genes	Azul	Intervalo de Tamanho Válido IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397 600 ^a 96, 197, 297, 397, 600 ^a

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

8. Interpretação dos Resultados

Embora os resultados positivos sejam altamente sugestivos de malignidade, 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 significativa, é importante ignorar picos que ocorram fora do intervalo de tamanho válido para cada master mix.

8.1. Análise

- 8.1.1. Comunique amostras que falhem a amplificação após a repetição do ensaio 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 ensaio para 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 ensaio e/ou reavalie as amostras quanto a troca de amostras.
- 8.1.4. Todos os controlos do ensaio devem ser examinados antes de interpretar os resultados da amostra.

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: <i>Tamanho Esperado dos Produtos Amplificados</i> . Não estão presentes rearranjos clonais. Prosseguir com a análise.	Estão presentes rearranjos clonais. Repetir o ensaio
Controlo Positivo (também pode ser um controlo de extração se for retirado material de controlo positivo através dos processos de extração)	O tamanho do produto é consistente com o tamanho esperado indicado na secção 10.1: <i>Tamanho Esperado dos Produtos Amplificados</i> . Prosseguir com a análise.	Produto fora do intervalo de tamanho esperado. Repetir o ensaio.

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
Specimen Control Size Ladder (este controlo da amplificação é <u>essencial</u> para amostras de quantidade e qualidade desconhecidas)	Se forem observados todos os picos a 96, 197, 297, 397 e 602 pares de bases, prosseguir com a análise. Uma vez que os fragmentos de PCR mais pequenos são preferencialmente amplificados, não é invulgar que o fragmento de 602 pares de bases apresente um sinal diminuído ou esteja totalmente em falta. Prosseguir com a análise.	Caso não sejam detetadas bandas, repetir o ensaio, <u>a menos que a amostra seja positiva</u> . Se apenas estiverem visíveis 1, 2 ou 3 bandas, reavale 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 os resultados esperados, a interpretação das amostras clínicas deve ser efetuada conforme se segue:

- Um ou dois picos positivos proeminentes^a dentro do intervalo de tamanho válido são assinalados como:
"Positivo para a deteção de rearranjo(s) clonais do gene da cadeia beta do recetor de células T, 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 picos positivos^a dentro do intervalo de tamanho válido é assinalada como:
"Negativo para a deteção de rearranjo(s) clonais do gene da cadeia beta do recetor de células T."

^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 colhidas após o 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) excedem a amplitude dos picos vizinhos adjacentes e são idênticos em tamanho aos produtos de amplicões previamente gerados a partir do mesmo doente usando 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 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 pares de bases 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 gerados com a master mix quando é utilizada a atribuição de cor predefinida nos sistemas de deteção por fluorescência ABI.

Tabela 8. Tamanho Esperado dos Produtos Amplificados

Master Mix	Alvo	Cor	ADN de Controlo	Ref. ^a Catálogo	Tamanho do produto (pares de bases)
<i>TCRB</i> Tube A	Vβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	Intervalo de Tamanho Válido	---	240 - 285
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	240 - 285, 271 ^a
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	264
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	295
<i>TCRB</i> Tube B	Vβ + Jβ2	Azul (Jβ2.X)	Intervalo de Tamanho Válido	---	240 - 285
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	240 - 285, 221 ^b
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	---
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	253
<i>TCRB</i> Tube C	Dβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	Intervalo de Tamanho Válido	---	170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1)
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	128 ^b , 170-210, 285-325, 337 ^b
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	309
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	295
Specimen Control Size Ladder	Múltiplos genes	Azul	Intervalo de Tamanho Válido	---	96, 197, 297, 397 602^c
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	96, 197, 297, 397, 602 ^c

^aNota: A banda de 271 pares de bases é particularmente observada em amostras com números reduzidos de células linfoides contaminantes.

^bNota: Podem ser detetados produtos específicos com 221 pares de bases (no Tubo B) e 128 e 337 pares de bases (no Tubo C) sob condições sub-ótimas. Se presentes, estas bandas terão habitualmente uma fraca intensidade.

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

10.2. Dados de Amostras

equipamento ABI.

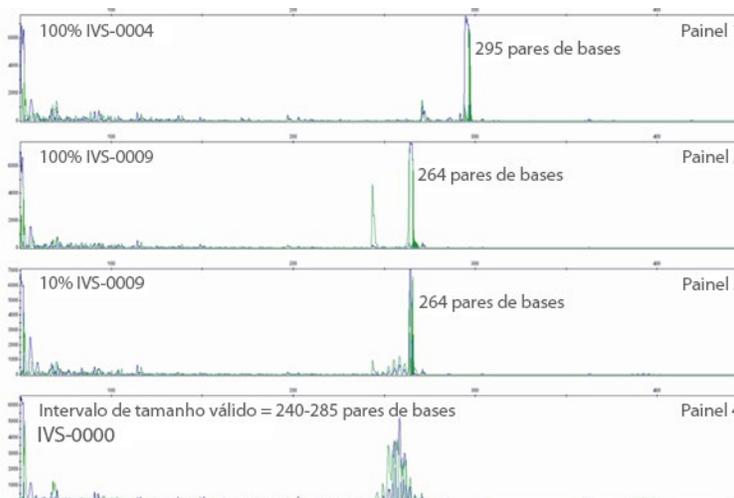


Figura 2. *TCRB* Tube A – 6FAM & HEX

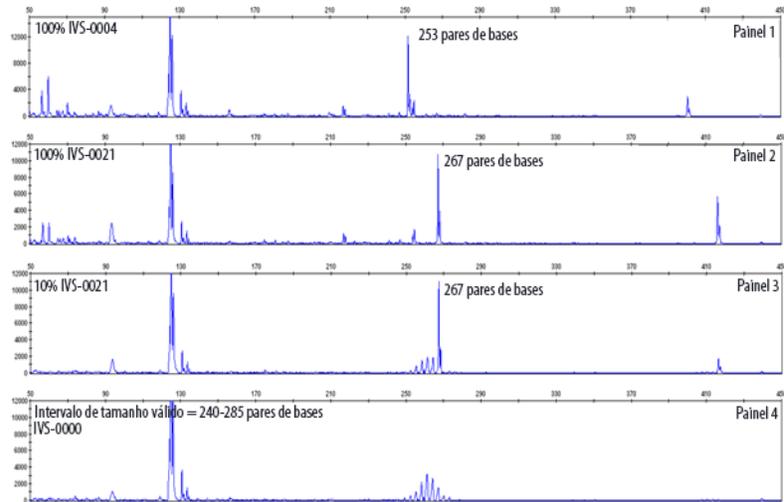


Figura 3. TCRB Tube B – 6FAM

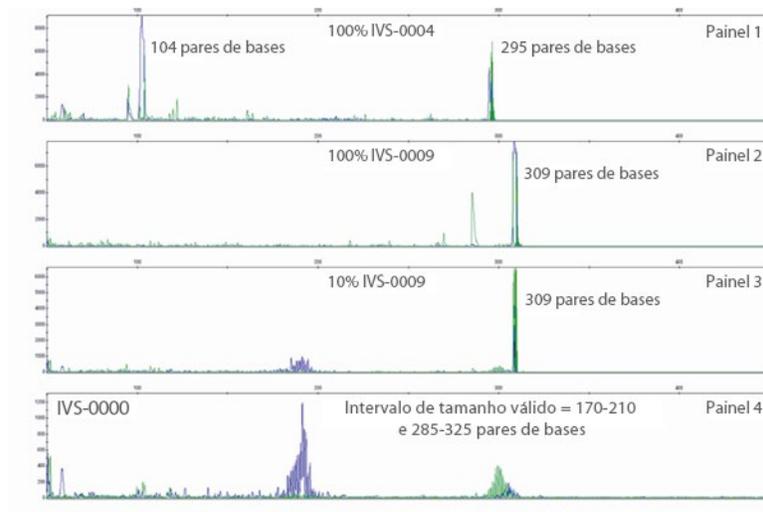


Figura 4. TCRB Tube C – 6FAM & HEX

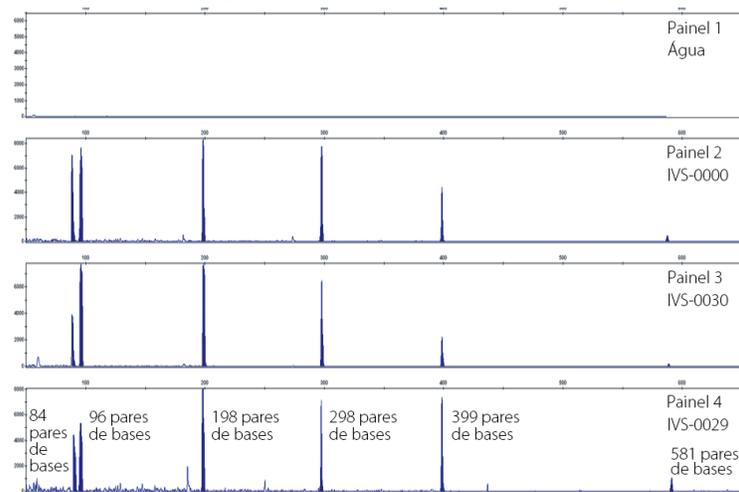


Figura 5. Specimen Control Size Ladder (escala de tamanho molecular) – 6FAM master mix

11. Características de Desempenho

Este teste de PCR IdentiClone *TCRB* 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. Tal é mostrado em dois artigos notáveis, um publicado em 2003 em *Leukemia* por van Dongen *et al.* e o outro publicado em 2005 em *The Journal of Molecular Diagnostics (JMD)* por Sandberg *et al.*

Tabela 9. Comparação da deteção por PCR e SB

Concordância PCR/SB (<i>Leukemia</i>): ²		Concordância PCR/SB (<i>JMD</i>): 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 vs. Análise de SB relativamente à histopatologia e ao diagnóstico final

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

O estudo independente realizado por Sandberg *et al.* incluiu amostras de 300 doentes com diversos tipos de amostras. 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 exatidão diagnóstica de ensaios selecionados IdentiClone foi determinada em pelo menos 96%. Isto mostrou ser bem mais exato 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 ensaios 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. 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

13. 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.

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.

Identiclone® 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.