



## **Elucigene® CF-EU2v1 Instruções de utilização**

**Cód. cat.:**    **CF2EUB2 – 50 testes**  
                  **CF2EUBX – 10 testes**



Utilização em diagnóstico in vitro



Fabricado pela:  
Elucigene Diagnostics  
Greenheys House  
Pencroft Way  
Manchester Science Park  
Manchester  
M15 6JJ

Para Vendas, Assistência ao Cliente e Assistência Técnica:

T: +44 (0) 161 669 8122

F: +44 (0) 161 669 8129

E: [enquiries@elucigene.com](mailto:enquiries@elucigene.com)

E: [techsupport@elucigene.com](mailto:techsupport@elucigene.com)



Elucigene Diagnostics is the trading name of Delta Diagnostics (UK) Limited., a company registered in England and Wales, registration number 8696299.

# Elucigene CF-EU2v1

## Utilização prevista

Para a detecção qualitativa simultânea in vitro das seguintes mutações do gene regulador da condutância transmembranar na fibrose cística (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, CFTR) responsáveis pela fibrose cística em humanos em DNA extraído de sangue total (conservado em EDTA) e amostras de gotas de sangue secas:

| Tradicional   | De acordo com as orientações da HGVS *              |                  |
|---------------|-----------------------------------------------------|------------------|
|               | cDNA name                                           | Protein name     |
| CFTRdele2,3   | c.54-5940_273+1025del (c.54-5940_273+10250del21080) |                  |
| E60X          | c.178G>T                                            | p.Glu60X         |
| P67L          | c.200C>T                                            | p.Pro67Leu       |
| G85E          | c.254G>A                                            | p.Glv85Glu       |
| 394delTT      | c.262_263del (c.262_263delTT)                       | p.Leu88IlefsX22  |
| 444delA       | c.313del (c.313delA)                                | p.Ile105SerfsX2  |
| R117C         | c.349C>T                                            | p.Arg117Cys      |
| R117H         | c.350G>A                                            | p.Arg117His      |
| Y122X         | c.366T>A                                            | p.Tyr122X        |
| 621+1G>T      | c.489+1G>T                                          |                  |
| 711+1G>T      | c.579+1G>T                                          |                  |
| L206W         | c.617T>G                                            | p.Leu206Trp      |
| 1078delT      | c.948del(c.948delT)                                 | p.Phe316LeufsX12 |
| R334W         | c.1000C>T                                           | p.Arg334Trp      |
| R347P         | c.1040G>C                                           | p.Arg347Pro      |
| R347H         | c.1040G>A                                           | p.Arg347His      |
| A455E         | c.1364C>A                                           | p.Ala455Glu      |
| I507del       | c.1519_1521del (c.1519_1521delATC)                  | p.Ile507del      |
| F508del       | c.1521_1523del (c.1521_1523delCTT)                  | p.Phe508del      |
| 1677delTA     | c.1545_1546del (c.1545_1546delTA)                   | p.Tyr515X        |
| V520F         | c.1558G>T                                           | p.Val 520Phe     |
| 1717-1G>A     | c.1585-1G>A                                         |                  |
| G542X         | c.1624G>T                                           | p.Glv542X        |
| S549R(T>G)    | c.1647T>G                                           | p.Ser549Arg      |
| S549N         | c.1646G>A                                           | p.Ser549Asn      |
| G551D         | c.1652G>A                                           | p.Glv551Asp      |
| R553X         | c.1657C>T                                           | p.Arg553X        |
| R560T         | c.1679G>C                                           | p.Arg560Thr      |
| 1811+1.6kbA>G | c.1680-886A>G                                       |                  |
| 1898+1G>A     | c.1766+1G>A                                         |                  |
| 2143delT      | c.2012del (c.2012delT)                              | p.Leu671X        |
| 2184delA      | c.2052del (c.2052delA)                              | p.Lvs684AsnfsX38 |
| 2347delG      | c.2215del (c.2215delG)                              | p.Val739TyrfsX16 |
| W846X         | c.2538G>A                                           | p.Trp846X        |
| 2789+5G>A     | c.2657+5G>A                                         |                  |
| Q890X         | c.2668C>T                                           | p.Gln890X        |
| 3120+1G>A     | c.2988+1G>A                                         |                  |

| Tradicional  | De acordo com as orientações da HGVS * |                   |
|--------------|----------------------------------------|-------------------|
|              | cDNA name                              | Protein name      |
| 3272-26A>G   | c. 3140-26A>G                          |                   |
| R1066C       | c.3196C>T                              | p.Arg1066Cys      |
| Y1092X(C>A)  | c.3276C>A                              | p.Tyr1092X        |
| M1101K       | c.3302T>A                              | p.Met1101Lys      |
| D1152H       | c.3454G>C                              | p.Asp1152His      |
| R1158X       | c.3472C>T                              | p.Arg1158X        |
| R1162X       | c.3484C>T                              | p.Arg1162X        |
| 3659delC     | c.3528del (c.3528delC)                 | p.Lys1177SerfsX15 |
| 3849+10kbC>T | c.3718-2477C>T                         |                   |
| S1251N       | c.3752G>A                              | p.Ser1251Asn      |
| 3905insT     | c.3773dup (c.3773dupT)                 | p.Leu1258PhefsX7  |
| W1282X       | c.3846G>A                              | p.Trp1282X        |
| N1303K       | c.3909C>G                              | p.Asn1303Lys      |

\* with reference to – *Mutation Nomenclature in Practice: Findings and Recommendations from the Cystic Fibrosis External Quality Assessment Scheme*. Berwouts S, Morris M, Girodon G, Schwarz M, Stuhmann M and Dequeker E. *Human Mutation*, Vol.00, No. 0, 1-7 (2011)

O CF-EU2v1 é capaz de distinguir entre indivíduos heterozigóticos e homozigóticos relativamente a todas as mutações e variantes acima, à excepção de S549R(T>G) – consulte a secção de reactividade cruzada deste documento.

## Resumo e explicação

A fibrose cística (FC) é a patologia autossómica recessiva limitante mais comum entre a população caucasiana. A incidência da doença é de 1:3200 nados-vivos nesta etnia (1). Na população caucasiana, a frequência de heterozigóticos é de aproximadamente 1:25.

A fibrose cística afecta o epitélio de diversos órgãos, resultando numa doença complexa e multissistémica que envolve o pâncreas exócrino, os intestinos, o aparelho respiratório, o aparelho genital masculino, o sistema hepatobiliar e as glândulas sudoríparas exócrinas. A expressão da doença varia segundo a gravidade das mutações do *CFTR* (2), dos modificadores genéticos (3) e dos factores ambientais (4). Esta gravidade varia desde morte no início da infância em resultado de doença pulmonar obstrutiva progressiva com broncoectasia, até insuficiência pancreática com doença pulmonar obstrutiva gradualmente progressiva durante a adolescência e aumento da frequência de hospitalizações motivadas por doenças pulmonares no início da idade adulta e até sinusite e bronquite recorrentes ou infertilidade masculina no início da idade adulta.

Habitualmente, o diagnóstico de fibrose cística é estabelecido em indivíduos com uma ou mais características fenotípicas de CF e dados de uma anomalia na função do CFTR com base em um dos seguintes aspectos: presença de duas mutações causadoras de doença no gene CFTR ou dois valores quantitativos anormais de cloro na iontoforese da transpiração estimulada pela pilocarpina (>60 mEq/l) ou determinações da diferença de potencial nasal transepitelial (NPD) características de CF. A taxa de detecção da mutação CFTR varia segundo o método analítico e a herança étnica. Em alguns indivíduos sintomáticos, apenas se detecta uma ou nenhuma mutação causadora de doença; em alguns portadores, a mutação causadora de doença não é detectável.

As doenças relacionadas com o CFTR são transmitidas de forma autossómica recessiva. Irmãos de um probando com fibrose cística têm uma probabilidade de 25% de estarem afectados, uma probabilidade de 50% de serem portadores assintomáticos e uma probabilidade de 25% de não serem afectados e não portadores. Os testes de genética molecular de mutações causadoras de doença(s) no gene CFTR são utilizados para a detecção de portadores em programas de rastreio na população. Existem testes pré-natais para gravidezes com maior risco de sofrer anomalias relacionadas com o CFTR se forem conhecidas mutações causadoras de doença na família.

Desde a descoberta do gene CFTR, em 1989 (5), foram descritas mais de 1700 mutações e variantes do gene (6). Muitas destas mutações são “privadas”, tendo sido descritas apenas num doente e/ou família. As análises de rotina de todas as mutações possíveis não são exequíveis nem rentáveis, estando assim confinadas à análise das mutações mais comuns. O CF-EU2v1 é um kit de testes da fibrose cística concebido especificamente para analisar as mutações mais comuns nas populações de origem europeia. No total, o ensaio identifica 50 mutações e analisa ainda o segmento poli-T do intrão 9 através da determinação exacta da repetição de TG adjacente.

O segmento polimórfico de timidina que se encontra na junção entre o intrão 9 e o exão 10 influencia a transcrição. O número de resíduos de timidina (5T, 7T ou 9T) afecta a eficiência de splicing do exão 10; se estiver presente o alelo 5T, estará ausente uma proporção dos produtos da transcrição do exão 10, que resulta em proteínas não funcionais e sintomas de CF variáveis. Há relatos de que o número de repetições de TG na extremidade 5' do segmento de politimidina pode também influenciar o splicing to exão 10 (7). Se presentes no mesmo alelo da variante 5T, quanto maior for o número de repetições de TG, maior a proporção de produtos de transcrição do CFTR que não possuem o exão 10. O número de repetições de TG pode ser determinado utilizando o CF-EU2v1 medindo os picos dos produtos de amplificação de 5T.

## Princípios do procedimento

O método utilizado pelo kit Elucigene CF-EU2v1 utiliza uma tecnologia de sistema de mutação refractária à amplificação (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) de fluorescência para amplificação específica de alelos, que detecta mutações, inserções ou deleções pontuais no DNA (8). O princípio do ARMS é que os oligonucleótidos com um resíduo não correspondente na extremidade 3' não funcionam como iniciadores da reacção em cadeia da polimerase (PCR) em condições específicas. A selecção de oligonucleótidos adequados permite a amplificação e detecção de sequências de DNA mutantes ou normais específicas. As sequências amplificadas (produtos de amplificação) são separadas por electroforese de capilares utilizando um analisador genético da Applied Biosystems. O software de análise permite a identificação e a marcação dos produtos de amplificação segundo o seu tamanho e a cor do corante.

O Elucigene CF-EU2v1 é um ensaio multifacetado que abrange duas reacções de PCR (A e B). Cinquenta sequências mutantes no gene CFTR são detectadas pela mistura A e visualizadas sob a forma de picos de produtos de amplificação azuis. As sequências normais (estirpe selvagem) correspondentes são detectadas pela mistura B e visualizadas sob a forma de picos de produtos de amplificação verdes. A mistura A detecta também uma sequência normal na mutação mais frequentemente observada enquanto causadora de fibrose cística em populações caucasianas, denominada F508del, que é visualizada sob a forma de um pico de produtos de amplificação verde. Além disso, as sequências repetidas de poli T são detectadas pela mistura A e visualizadas sob a forma de picos de produtos de amplificação pretos. Estão incluídos marcadores de controlo interno da amplificação (não associados a fibrose cística) nas misturas A e B para monitorizar a eficiência da amplificação das amostras, sendo visualizadas sob a forma de picos de produtos de amplificação vermelhos.

## **Advertências e precauções**

1. O controlo de DNA fornecido com este kit é de origem humana e foi analisado independentemente com um ensaio de PCR, tendo-se verificado que é negativo para o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV) e o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV1).
2. Há que ter cautela quando se manuseia material de origem humana. Todas as amostras devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Nenhum método de teste pode garantir totalmente a ausência de HBV, HCV, HIV 1 ou de outros agentes infecciosos.
3. O manuseamento das amostras e dos componentes dos testes, a sua utilização, o seu armazenamento e a sua eliminação devem estar de acordo com os procedimentos definidos pelas orientações ou regulamentos nacionais de segurança biológica.
4. De acordo com as boas práticas de laboratório actuais e para que se possa avaliar a validade do procedimento, os laboratórios devem processar em cada ensaio as suas próprias amostras de QC interno de genótipo conhecido.
5. Se a caixa do kit estiver danificada, o conteúdo poderá estar danificado; não utilize o kit e contacte o Apoio ao Cliente

## Símbolos utilizados nos rótulos

Os símbolos utilizados em todos os rótulos e embalagens estão em conformidade com a norma ISO15223 harmonizada



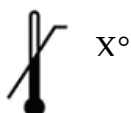
Fabricante



Número de análises



Consulte as instruções de utilização



Armazene abaixo da temperatura indicada



Utilize até à data indicada



Código de catálogo



Número de lote



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

## **Materiais fornecidos**

Os reagentes devem ser armazenados em áreas isentas de DNA ou produtos de PCR contaminantes.

Todos os reagentes são fornecidos prontos a utilizar. Armazene os reagentes abertos e por abrir a -20 °C. Os reagentes abertos podem ser armazenados durante até 3 meses.

São fornecidos materiais suficientes para 50 (10) análises:

2 x ampolas de 120µl (50µl) de mistura de iniciadores A para CF-EU2v1, contendo iniciadores para amplificar os seguintes alelos mutantes R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, F508del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X e R1158X. Esta mistura contém também iniciadores de estirpe selvagem para a detecção do alelo F508del normal, iniciadores para a detecção das variantes de politimidina, IVS8-5T, IVS-7T e IVS8-9T, e iniciadores para a identificação de dois marcadores de microssatélites (short-tandem repeat, STR) hipervariáveis – 404473 (450043).

2 x ampolas de 120µl (50µl) de mistura de iniciadores B para CF-EUv1, contendo iniciadores de estirpe selvagem para amplificar os alelos normais dos mutantes amplificados pela mistura de iniciadores A, à excepção do F508del, o alelo normal, que é amplificado pelos iniciadores incluídos na mistura A. Esta mistura contém ainda iniciadores para a identificação de dois marcadores STR hipervariáveis – 404474 (450044).

2 x ampolas de 400µl (75µl) de mistura principal para PCR contendo DNA polimerase HotStart Taq e trifosfatos de desoxinucleótidos em tampão – 404480 (450045).

1 x ampola de 50 µl de controlo de DNA a 6 ng/µl, normal para as mutações detectadas pelo Elucigene CF-EU2v1 – 404489

## **Materiais necessários, mas não fornecidos**

***Consumíveis de laboratório – luvas, tubos de microcentrifuga de tampa de rosca, ampolas para PCR de 0,2 ml ou placas de microtitulação recomendadas pelo fabricante do termociclador utilizado; pontas de pipeta.***

Preparação do DNA - QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, N.º Cat 51304/51306) ou equivalente.

Electroforese de capilares – padrão de tamanho GeneScan 600 LIZ (N.º Cat. ABI 4366589), padrão de tamanho GeneScan 600v2 LIZ (N.º Cat. ABI 4408399), padrão de matriz multicapilares DS-33 (conjunto de corantes G5) (N.º Cat. ABI 4345833), polímero POP-7 (N.º Cat. ABI 4352759), 10x tampão para analisador genético (N.º Cat. ABI 402824) e formamida Hi-Di (ABI Cat No 4311320).

*Nota: Assegure-se de que todos os materiais utilizados se encontram dentro do prazo de estabilidade definido pelo fabricante.*

## **Equipamento necessário**

Equipamento de laboratório – pipetas de precisão (2 conjuntos: 1 para utilizar antes da amplificação e 1 para depois da amplificação); vestuário de protecção, agitador vórtex; microcentrifuga; centrífuga de placas de microtitulação de 96 poços.

Amplificação por PCR – Termociclador onde caibam placas de microtitulação de 96 poços ou ampolas de 0,2 ml, com exactidão mínima da temperatura de +/-1 °C entre 33 °C e 100 °C e uniformidade da temperatura estática de +/-1 °C.

*Nota: O equipamento do termociclador deve ser mantido regularmente obedecendo às instruções do fabricante e calibrado de forma a garantir a exactidão dos ciclos de PCR e um desempenho ideal. O ensaio Elucigene CF-EU2v1 foi desenvolvido em termocicladores Applied Biosystems 9700. Outras marcas e modelos deverão ser cabalmente testados e avaliados pelo utilizador para verificar se o seu desempenho é o ideal antes de os resultados relativos ao CF-EU2v1 serem lançados.*

Electroforese de capilares – analisador genético ABI 3130/3500 (com software de análise de fragmentos GeneMapper), matriz de capilares de 36 cm ou 50 cm (ABI3500), placas ópticas de 96 poços, septos de 96 poços, cassetes de 96 poços.

*Nota: O equipamento de electroforese de capilares deve ser mantido regularmente obedecendo às instruções do fabricante e calibrado de forma a garantir um desempenho ideal.*

## **Colheita e armazenamento de amostras**

Efectuou-se a avaliação de sangue total (EDTA) e gotas de sangue seco quanto à sua compatibilidade com este teste.

Há relatos de alguns casos em que dispositivos de colheita de amostras afectaram a integridade de determinados analitos e podem interferir com as tecnologias de alguns métodos (9). Recomenda-se que cada utilizador zeze para que o dispositivo escolhido seja utilizado de acordo com as instruções do fabricante e que os dispositivos de colheita de amostras sejam compatíveis com este teste.

As amostras de sangue devem ser armazenadas a -20 °C antes da preparação do DNA. Evite congelar e descongelar repetidas vezes.

### **Preparação de DNA a partir de amostras de sangue total (EDTA)**

São obtidos resultados consistentes com o DNA extraído por meio do QIAamp 96 DNA Blood Kit (ou o QIAamp DNA Mini Kit com Proteinase K) seguindo o protocolo descrito no Manual QIAamp, partindo de 200 µl de sangue total líquido e eluindo-o em 200 µl de água de pureza adequada a biologia molecular.

### **Preparação de DNA a partir de gotas de sangue seco**

São obtidos resultados consistentes com o DNA extraído por meio do QIAamp DNA Mini Kit seguindo o protocolo descrito no Manual QIAamp, mas partindo de discos de 2 x 3 mm de uma gota de sangue seco e eluindo-os em 100 µl de água de pureza adequada a biologia molecular.

Recomenda-se que métodos de extracção de DNA e tipos de amostra alternativos sejam cabalmente avaliados com o teste Elucigene CF-EU2v1 antes de os resultados serem utilizados para fins de diagnóstico.

### **Considerações importantes – Quantidade de DNA**

Em condições de PCR ideais e utilizando as definições de injeção de amostras recomendadas (consulte a nota na secção de electroforese de capilares) indicadas nos módulos de execução de colunas de capilares, têm sido repetidamente obtidos resultados aceitáveis a partir de DNA extraído utilizando os métodos atrás referidos em concentrações de 1,5 ng/µl a 25 ng/µl. A quantificação do DNA é muito importante, pelo que a concentração de cada amostra de DNA a analisar deve ser determinada para garantir a obtenção dos melhores resultados. São aceitáveis técnicas como a fluorescência PicoGreen ou a absorvência de UV. Devido às variações entre as técnicas de quantificação de DNA, o utilizador deve ter em consideração as seguintes orientações:

Quantidades de DNA de entrada muito elevadas aumentam a probabilidade de marcação de picos de fundo pelo software de análise. Podem ser tomadas as seguintes medidas para reduzir a probabilidade de marcação de picos de fundo.

- Dilua a amostra de DNA e volte a amplificar
- Reduza o tempo de injeção – consulte a secção de electroforese de capilares

- Aumente o limiar mínimo de amplitude do pico – consulte o Guia do software de análise do Elucigene CF-EU2v1

Quantidades baixas de DNA de entrada aumentam a probabilidade de os picos de diagnóstico serem fracos e não serem marcados pelo software de análise. Podem ser tomadas as seguintes medidas para aumentar o sinal.

- Aumente o tempo de injeção para 36 segundos (vivamente recomendado para extracções a partir de gotas de sangue seco) – consulte a secção de electroforese de capilares
- Volte a extrair a amostra de gotas de sangue seco e elua num volume reduzido (50 µl) de água
- Aumente o número de gotas de sangue seco para extracção quando utiliza discos de 4 x 3 mm

**Considerações importantes – Qualidade do DNA**

O CF-EU2v1 é um ensaio altamente multifacetado e requer uma amplificação por PCR eficiente para funcionar da melhor forma. A qualidade do DNA pode determinar a eficiência do processo de PCR. Os inibidores extraídos concomitantemente com a amostra de DNA podem resultar numa amplificação insuficiente, originando picos fracos e mal equilibrados. A Elucigene Diagnostics validou a utilização do QIAamp 96 DNA Blood Kit e do QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH) com o kit CF-EU2v1. Outros kits ou métodos de extracção de DNA devem ser validados e optimizados para a utilização com o CF-EU2v1.

**Nota:** Consulte o Guia de resolução de problemas do Elucigene CF-EU2v1 para mais informações.

## Protocolo do ensaio

### Controlo da contaminação da PCR

O processo de PCR gera um grande número de produtos amplificados (produtos de amplificação) e acarreta um risco elevado de contaminação que pode falsear os resultados. A contaminação pode provir de duas fontes:

Contaminação cruzada – contaminação da amostra com material não amplificado que provenha do ambiente ou de outras amostras que contenham a sequência alvo.

Contaminação do produto final – contaminação da amostra com produtos de amplificação de PCR prévias, levando à amplificação dos produtos de amplificação tanto do alvo como dos contaminantes.

Os laboratórios que realizam PCR devem estar cientes destas fontes de contaminação e implementar procedimentos que reduzam significativamente o risco de contaminação. Os métodos para controlar a contaminação estão bem documentados (10) e incluem a concepção física dos laboratórios, o fluxo de trabalho, os procedimentos de manuseamento de amostras e as abordagens químicas e enzimáticas. É essencial seguir procedimentos de laboratórios bons e bem definidos para controlar a contaminação da PCR, devendo estes ser implementados antes da análise de amostras clínicas.

### Procedimento de amplificação

**Nota:** Para minimizar o risco de contaminação, as etapas 3 – 5 têm de ser realizadas numa área isenta de produtos de PCR, de preferência numa câmara de fluxo laminar.

1. *Programe o termociclador para um ciclo de etapa única para activar o HotStart Taq a 94 °C, durante 20 minutos, ligado a um programa de ciclos de amplificação de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 2 minutos a 58 °C (hibridação) e 1 minuto a 72 °C (extensão) para 30 ciclos. Este deve estar ligado a um ficheiro de tempo de atraso de 20 minutos a 72 °C (extensão) no ciclo final.*
2. *É necessário incluir-se um controlo negativo em cada execução de PCR.*
3. *Descongele as misturas de iniciadores e a mistura principal para PCR e centrifugue um pouco para recolher o conteúdo do fundo das ampolas. Agite suavemente no vórtex para misturar e volte a centrifugar um pouco as ampolas. Prepare mistura de reacção suficiente para o número de amostras e controlos a testar (Tabela 1).*

Nota: A mistura principal para PCR é viscosa e é necessário ter cuidado para assegurar que se lida com os volumes correctos. Recomenda-se a adição da mistura principal para PCR às misturas de iniciadores previamente distribuídas para garantir que todo o líquido é distribuído pela pipeta na mistura de iniciadores.

Nota: Não utilize misturas ou componentes diferentes de lotes diferentes do kit CF-EU2v1.

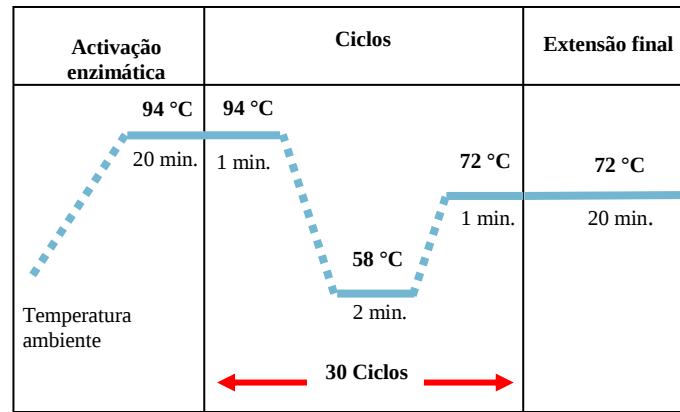


Tabela 1: Formulação da mistura de reacção

|                                 | Número de amostras a testar |     |       |     |
|---------------------------------|-----------------------------|-----|-------|-----|
|                                 | 1                           | 10  | 25    | 50  |
| Mistura de iniciadores (µl)     | 4,5                         | 45  | 112,5 | 225 |
| Mistura principal para PCR (µl) | 7,5                         | 75  | 187,5 | 375 |
| Total (µl)                      | 12                          | 120 | 300   | 600 |

- Pipete 10 µl de cada mistura de reacção para o fundo de ampolas ou placas para PCR de 0,2 ml devidamente rotuladas.
- Utilizando pontas de pipeta distintas, adicione 2,5 µl de amostra de DNA de teste a cada uma das ampolas e coloque a tampa. Não adicione DNA à ampola para controlo negativo, substitua por 2,5 µl de água desionizada esterilizada.
- Centrifugue um pouco as ampolas de PCR para recolher o conteúdo do fundo das ampolas.
- Coloque firmemente as ampolas no bloco do termociclador. Inicie o ciclo de etapa única de 94 °C, seguido do programa de ciclos de amplificação.
- Concluído o programa de ciclos de amplificação, as amostras podem ser armazenadas durante a noite à temperatura ambiente ou a 2 °C – 8 °C, durante 7 dias, no escuro, até à análise por electroforese de capilares.

### Electroforese de capilares

Recomenda-se que cada utilizador zele para que o equipamento de electroforese de capilares escolhido seja utilizado de acordo com as instruções do fabricante e seja compatível com este teste. Neste contexto, os parâmetros principais são o polímero e a matriz de capilares. Podem obter-se os melhores resultados nas seguintes condições de electroforese de capilares:

- Combine 6,8 µl de padrão de tamanho GS600v2 LIZ com 250 µl de formamida Hi-Di e misture bem (mistura suficiente para 16 poços). Distribua 15 µl da mistura por cada poço de uma placa de PCR de 96 poços.
- Adicione 3 µl de produto de PCR de cada uma das amplificações das misturas A e B para distinguir os poços que contêm o padrão de tamanho/mistura de formamida (da etapa 1) já distribuído na placa.

3. *Desnature o produto de PCR distribuído na placa de PCR num termociclador utilizando os seguintes parâmetros: 94 °C durante 3 minutos ligado a 4 °C durante 30 segundos.*
4. *Centrifugue um pouco a placa para recolher o conteúdo no fundo das ampolas e para remover eventuais bolhas existentes nos poços e introduza-a imediatamente no analisador genético.*

**Nota:** As definições de injeção de amostras podem ser modificadas consoante a quantidade de produto de amplificação produzido durante a PCR, que pode variar devido à quantidade de DNA genómico inicialmente introduzida. Pode aplicar-se menos produto de amplificação à coluna para análise reduzindo o tempo ou a tensão de injeção. Inversamente, pode aplicar-se mais produto de amplificação à coluna para análise aumentando o tempo ou a tensão de injeção. Amostras previamente amplificadas podem ser reinjectadas diversas vezes para reanálise – consulte o Guia de resolução de problemas do Elucigene CF-EU2v1 para mais informações.

**Instrumentos ABI 3130:**

É necessário criar um módulo de execução e um protocolo para CF-EU2, que podem depois ser utilizados em cada execução de CF-EU2.

Crie o módulo execução de CF-EU2 no **Module Manager** (gestor de módulos do software) do software de recolha de dados 3130. Certifique-se de que são seleccionadas as seguintes características:

- *Type (Tipo): regular*
- *Template (Modelo): FragmentAnalysis36\_POP7*
- *Insira as definições descritas na tabela abaixo:*

**Módulo de capilares de 36 cm**

| #  | Nome do parâmetro                                    | Valor  | Intervalo           |
|----|------------------------------------------------------|--------|---------------------|
| 1  | Oven Temperature (Temperatura da estufa)             | 60     | int 18...65 °C      |
| 2  | Poly_Fill_Vol. (Vol_Ench_Poli)                       | 6500   | 6500...38000 etapas |
| 3  | Current Stability (Estabilidade da corrente)         | 5,0    | int 0...2000 uA     |
| 4  | PreRun_Voltage (Tensão pré-execução)                 | 15,0   | 0...15 kV           |
| 5  | Pre_Run_Time (Tempo pré-execução)                    | 180    | 1...1000 s          |
| 6  | Injection_Voltage (Tensão injeção)                   | 3,0    | 1...15 kV           |
| 7  | Injection_Time (Tempo injeção)                       | 12,0** | 1...600 s           |
| 8  | Voltage_Number_Of_Steps<br>(Tensão_Número_de_etapas) | 20     | 1...100 nk          |
| 9  | Voltage_Step_Interval<br>(Intervalo_passos_tensão)   | 15     | 1...60 s            |
| 10 | Data_Delay_Time (Tempo_atraso_dados)                 | 60     | 1...3600 s          |
| 11 | Run_Voltage (Tensão execução)                        | 15,0   | 0...15 kVs          |
| 12 | Run_Time (Tempo execução)                            | 1200   | 300...14000 s       |

\*\* Aumente o tempo de injeção para 36 segundos para a análise de DNA extraído de gotas de sangue seco

**Nota:** O “tempo de execução” necessário varia consoante a temperatura ambiente do local onde o analisador genético está instalado. Para mais informações acerca da criação de módulos de execução, queira consultar o Manual de utilização do analisador genético 3130 da Applied Biosystems.

Crie o protocolo para CF-EU2 no **Protocol Manager** (gestor de protocolos) e assegure-se de que selecciona as seguintes características:

- *Tipo: regular*
- *Run Module (Módulo de execução): CF-EU2 (ver modulo de execução acima)*
- *Dye Set (Conjunto de corantes): G5*

Para executar as amostras, crie uma ficha de amostras utilizando o **Plate Manager** (gestor de placas) e assegure-se de que foi seleccionado o protocolo correcto para CF-EU2v1 para o protocolo do instrumento (ver acima).

**Nota:** Para mais informações acerca da configuração, operação e resolução de problemas do instrumento, queira consultar o Manual de utilização do analisador genético 3130 da Applied Biosystems.

**Instrumentos ABI 3500:**

É necessário criar um **Instrument Protocol** (protocolo do instrumento) para CF-EU2, que pode depois ser utilizado em cada execução do CF-EU2v1.

Crie o **Instrument Protocol** (protocolo do instrumento) para CF-EU2 através da biblioteca de protocolos do instrumento 3500. Certifique-se de que são seleccionadas as seguintes características:

- *Run Module (Módulo de execução):* FragmentAnalysis50\_POP7
- *Insira as definições descritas na imagem abaixo:*

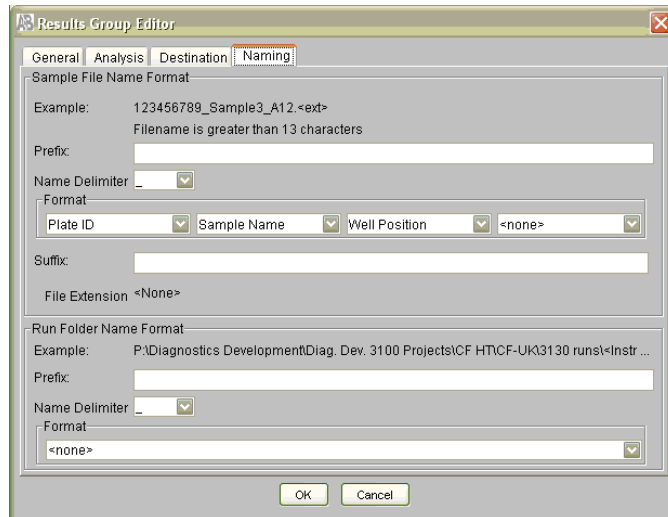
\*\* Aumente o tempo de injeção para 36 segundos para a análise de DNA extraído de gotas de sangue seco

Para executar as amostras, crie uma placa de amostras clicando em **“Create Plate from Template”** (criar placa a partir de modelo) no **“Dashboard”** (painel) e assegure-se de que foi atribuído o protocolo do instrumento correcto para CF-EU2v1 (ver acima).

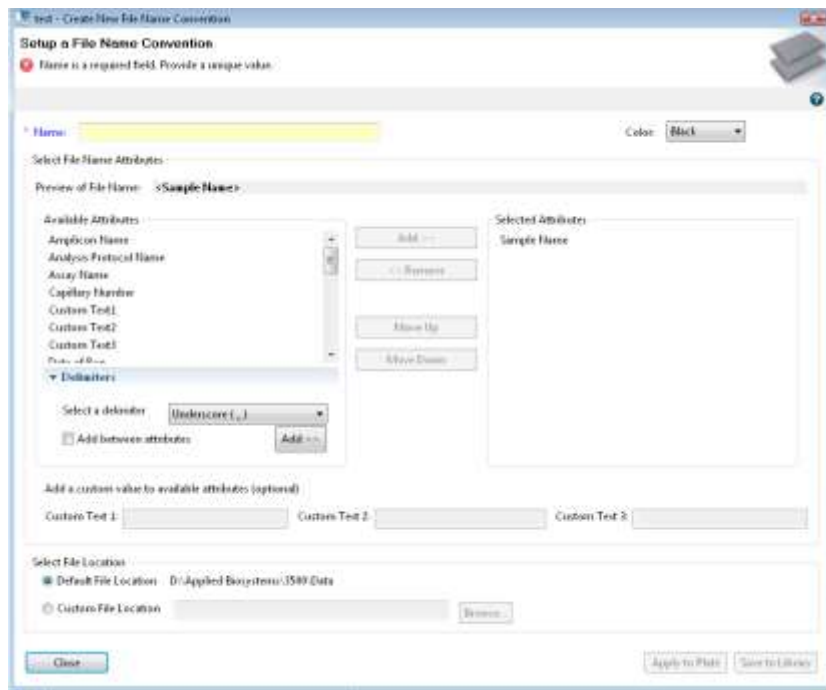
### Definição da ficha de amostras para o GeneMarker:

O software GeneMarker permite a comparação directa entre dados A e B do mesmo indivíduo. Para que tal possa ser feito facilmente, é importante que a atribuição de nomes aos ficheiros de dados de saída não tratados (fsa) seja coerente em todas as amostras e misturas. A ficha de amostras deve conter o nome único da amostra para cada amostra a testar, adicionando-se o sufixo **\_A** ou **\_B** consoante a mistura testada. Caso se pretenda incluir a identificação da placa no nome do fsa, deve utilizar-se sempre um formato fixo, p. ex., CFEU2 DDMMAAAA.

No instrumento **3130** os parâmetros do “Results Destination” (Destino dos resultados) devem ser definidos de modo a que o nome da amostra seja incluído no nome do ficheiro fsa, p. ex., CFEU2 DDMMAAAA\_1234,5\_A\_A01.



No instrumento **3500**, a convenção do nome do ficheiro deve ser definida de modo a que o nome da amostra seja incluído no nome do ficheiro fsa, p. ex., CFEU2DDMMAAAA\_1234,5\_A\_A01.



### Interpretação dos resultados

*Durante a recolha de dados, os fragmentos de PCR são observados sob a forma de picos azuis (mutantes) ou verdes (estirpe selvagem) no electroforograma de dados não tratados. Cada indivíduo possui duas cópias do gene CFTR. Quando estas cópias possuem a mesma sequência num dado local, diz-se que o indivíduo é homozigótico relativamente a este local. Quando estas cópias possuem sequências diferentes num dado local, diz-se que o indivíduo é heterozigótico relativamente a este local.*

*Depois de terminar a colheita de dados, os fragmentos de PCR de CF-EU2v1 devem ser medidos frente ao padrão de tamanho GS600v2 LIZ utilizando o software de análise de fragmentos.*

**O Guia do software de análise do Elucigene CF-EU2v1 apresenta mais orientações detalhadas acerca das definições do software, da análise e a interpretação. O sítio Web da Elucigene Diagnostics disponibiliza procedimentos do Guia do software de análise para os softwares GeneMapper e para o GeneMarker:**

[www.elucigene.com/products](http://www.elucigene.com/products)

*Os resultados da mistura A (mutante) determinam se um indivíduo é portador de alguma mutação, o que é mostrado pela presença de um pico azul. A mistura mutante contém também iniciadores do alelo normal F508, pelo que esta mistura consegue determinar se um indivíduo apresenta F508 normal (apenas pico verde), se é homozigótico para o mutante F508del (apenas pico azul) ou se é heterozigótico para F508del (pico azul e pico verde).*

*Se for observada qualquer outra mutação, os resultados da mistura B (estirpe selvagem) podem ser analisados para determinar se a mistura é homozigótica ou heterozigótica. A presença de um pico verde para um determinado alelo na mistura de estirpe selvagem indica que o indivíduo é heterozigótico e a ausência de um pico verde indica que é homozigótico para aquela mutação em particular.*

*São incluídos marcadores STR hipervariáveis (vermelhos) em ambas as misturas. Isto permite a comparação entre a amostra amplificada com a mistura mutante e a amostra amplificada com a mistura de estirpe selvagem para reduzir a probabilidade de as amostras serem confundidas; um perfil STR diferente em cada uma das duas misturas indica que houve confusão de amostras. A ausência destes marcadores STR indica que a amostra falhou. A presença de marcadores STR com RFU muito baixas indica uma amostra fraca, que deve ser analisada com cautela.*

**Nota:** Consulte o Guia de resolução de problemas para mais informações.

**Marcadores detectados**

A tabela que se segue resume os marcadores detectados pela mistura CF-EU2v1. Os marcadores são indicados por intervalo de tamanhos do produto de PCR observado.

**Marcadores detectados**

| Marcador<br>(N.º Pico) | Marcador      | Produto bp Tamanho Intervalo<br>(dados 3130/POP7) |
|------------------------|---------------|---------------------------------------------------|
| 01                     | R347H         | 110.5-116.5                                       |
| 02                     | R347P         | 117-123                                           |
| 03                     | 2789+5G>A     | 124-130                                           |
| 04                     | 3120+1G>A     | 132.5-138.5                                       |
| 05                     | 711+1G>T      | 141.5-147.5                                       |
| 06                     | R334W         | 147.5-154                                         |
| 07                     | I507del       | 156-162.5                                         |
| 08                     | F508del       | 163-169                                           |
| 09                     | 3849+10KbC>T  | 172-178                                           |
| 10                     | 1677delTA     | 180-188.5                                         |
| 11                     | 1078delT      | 193-199                                           |
| 12                     | V520F         | 206-211.5                                         |
| 13                     | L206W         | 215-220                                           |
| 14                     | W1282X        | 224.5-230.5                                       |
| 15                     | R560T         | 234.5-240.5                                       |
| 16                     | 2347delG      | 242-246                                           |
| 17                     | Q890X         | 250-252                                           |
| 18                     | R553X         | 255.5-261.5                                       |
| 19                     | G551D         | 265-267                                           |
| 20                     | S549R(T>G)*   | 267.5-269.5                                       |
| 21                     | S549N         | 275-280                                           |
| 22                     | M1101K        | 282-288                                           |
| 23                     | G542X         | 289-295.5                                         |
| 24                     | 3905insT      | 297-303.5                                         |
| 25                     | Y1092X(C>A)   | 308-314                                           |
| 26                     | S1251N        | 315-321                                           |
| 27                     | 444delA       | 323-326                                           |
| 28                     | 1811+1.6kbA>G | 332-338                                           |
| 29                     | 1717-1G>A     | 341.5-347.5                                       |
| 30                     | R117H         | 349-355                                           |
| 31                     | R117C         | 357-360                                           |
| 32                     | N1303K        | 360-366.5                                         |
| 33                     | Y122X         | 367-373                                           |
| 34                     | 394delTT      | 377-383                                           |
| 35                     | G85E          | 384-390                                           |
| 36                     | R1066C        | 391-397                                           |
| 37                     | 1898+1G>A     | 398.5-404.5                                       |
| 38                     | W846X         | 406-411                                           |
| 39                     | 2184delA      | 413-418                                           |
| 40                     | D1152H        | 423-429                                           |
| 41                     | CFTRdel2,3    | 433-439                                           |
| 42                     | P67L          | 439.5-445.5                                       |
| 43                     | 2143delT      | 446-450.5                                         |
| 44                     | E60X          | 453.5-460.5                                       |
| 45                     | 3659delC      | 461-465.5                                         |
| 46                     | 3272-26A>G    | 470-476                                           |
| 47                     | 621+1G>T      | 485.5-491.5                                       |

| N.º Marcador | Marcador | Produto bp Tamanho Intervalo (dados 3130/POP7) |
|--------------|----------|------------------------------------------------|
| 48           | A455E    | 496-503                                        |
| 49           | R1162X   | 506-512                                        |
| 50           | R1158X   | 516.5-524.5                                    |
| 5T**         | IVS8-5T  | 110-130                                        |
| 7T           | IVS8-7T  | 140-160                                        |
| 9T           | IVS8-9T  | 175-195                                        |

**\*S549R(T>G)**

O pico 20 só está presente na mistura A.

**\*\* Tamanhos de alelos 5T**

| Marcador | Produto bp Tamanho Intervalo (dados 3130/POP7) |
|----------|------------------------------------------------|
| 5T (9)   | 117.25 – 118.75                                |
| 5T (10)  | 119.25 – 120.75                                |
| 5T (11)  | 121.25 – 122.75                                |
| 5T (12)  | 123.25 – 124.75                                |
| 5T (13)  | 125.25 – 126.75                                |

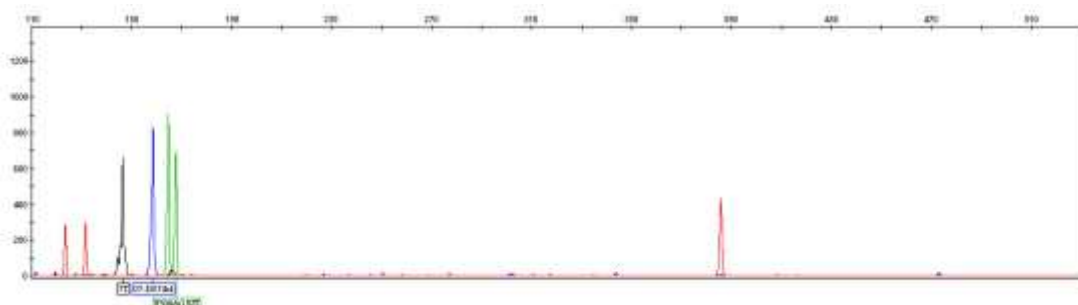
**NOTA:** Os tamanhos dos marcadores podem variar consoante o aparelho e o polímero utilizados.

**Exemplos de interpretação****I507del**

Devido à localização da deleção I507del no gene CFTR, é possível detectar a presença deste marcador através de um desvio de 3 bp no tamanho do pico de F508del, assim como um pico específico da mutação I507del.

Caso esteja presente um só alelo mutante I507del, o pico mutante que lhe corresponde será observado sob a forma de um pico azul a aproximadamente 159 bp. Será observado como presente um pico de estirpe selvagem para F508, mas a altura do pico será cerca de metade da normalmente associada a um genótipo de estirpe selvagem homozigótico; este é observado sob a forma de um pico verde a cerca de 167 bp. Observar-se-á ainda um outro pico verde a cerca de 164 pb.

Amostra heterozigótica I507del

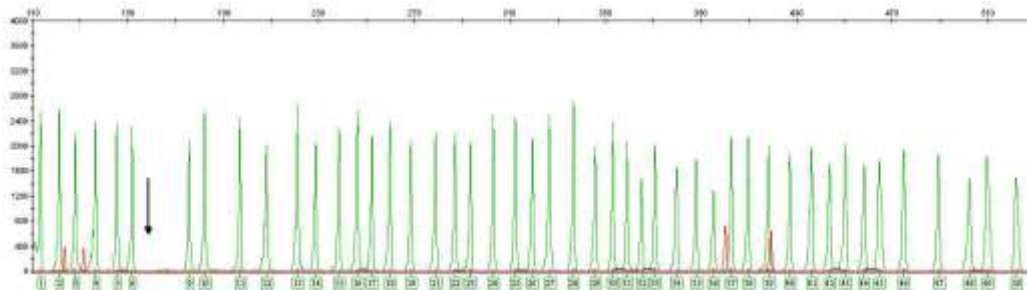


Uma amostra I507del/F508del produz um pico WT F508del verde desviado a aproximadamente 164 bp (menos 3 bp que o normal), um pico M F508del azul a 166 bp e um pico M I507del azul a cerca de 159 bp.

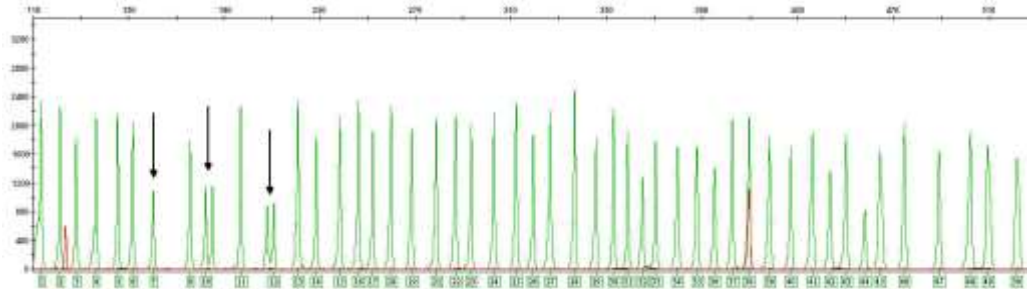
Uma amostra I507del/I507del resulta num pico azul a aproximadamente 159 bp e num pico verde único a cerca de 164 bp (3 bp inferior ao pico F508 normal observado quando I507del não está presente).

#### F508del

A presença de uma mutação F508del impede o iniciador WT I507del de funcionar. Consequentemente, um indivíduo homozigótico para F508del não apresenta um pico WT I507del na mistura WT (ver abaixo).



Um pico WT I507del de altura reduzida e dois picos com 3 bp de intervalo, nas posições 10 e 12 da mistura WT (ver abaixo) são observados nos resultados da mistura B para indivíduos heterozigóticos para F508del.



#### Inserções e deleções

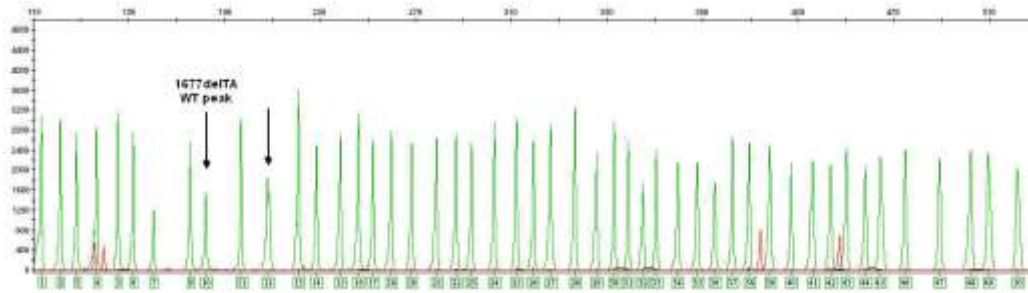
*Devido à natureza do desenho do kit CF-EU2v1, a presença de inserções ou deleções entre dois iniciadores opostos resulta em variações do tamanho da totalidade do produto de amplificação produzido entre estes dois iniciadores. Por conseguinte, além das 50 mutações detectadas pelo kit CF-EU2v1, quaisquer inserções e deleções no interior das sequências alvo amplificadas podem ser detectadas através da variação do tamanho esperado do produto de amplificação na mistura de estirpe selvagem (B). Estas foram tabeladas e estão disponíveis em documento à parte no sítio Web da Elucigene Diagnostics:*

[www.elucigene.com/products](http://www.elucigene.com/products)

São apresentados abaixo exemplos de inserções e deleções detectadas pelo kit e do impacto que têm no perfil da mistura B:

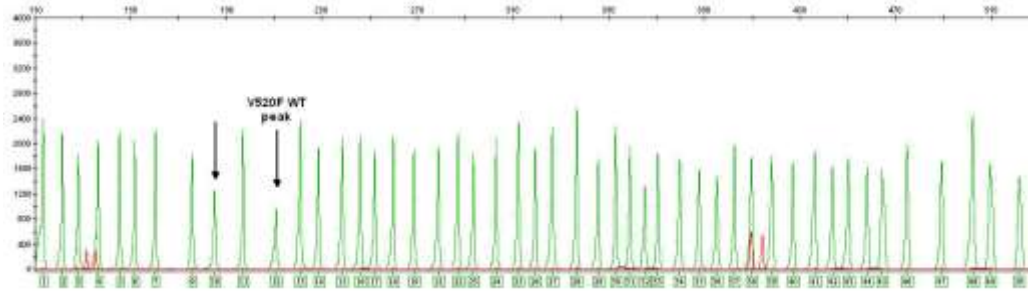
#### F508del/1677delTA

São observados dois picos com 1 bp de intervalo, na posição 12 (V520F WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para as mutações F508del/1677delTA.



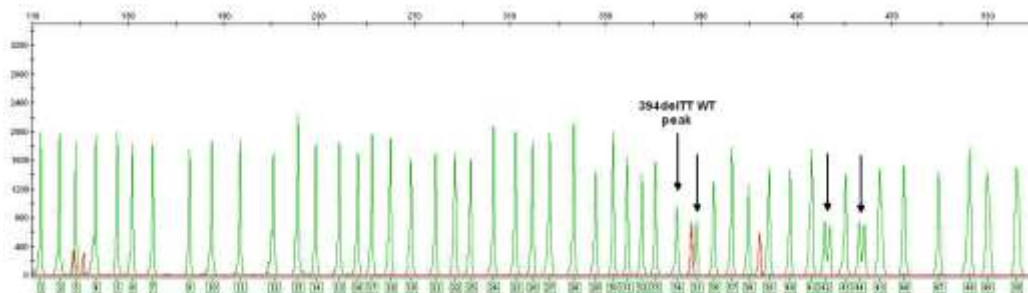
### V520F

É observado um pico de estirpe selvagem de altura reduzida, na posição 10 (1677delTA WT), nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação V520F, pois isto impede o iniciador 1677delTA WT de funcionar. Os picos 10 e 12 desaparecem dos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação V520F.



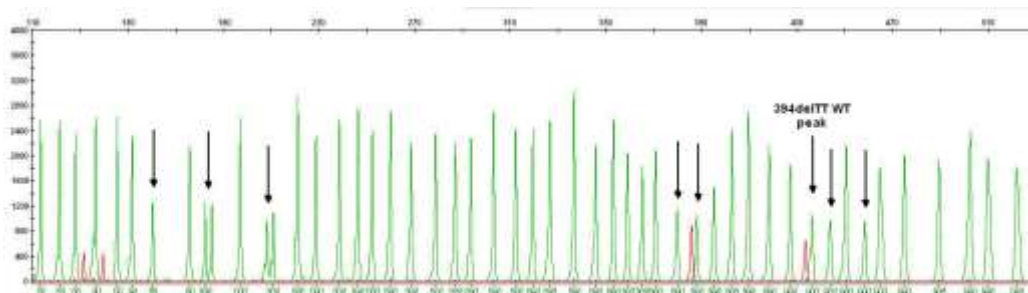
### 394delTT

São observados dois picos com 2 bp de intervalo, nas posições 35 (G85E WT), 42 (P67L WT) e 44 (E60X WT), nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação 394delTT. O pico 34 desaparece e os picos 35, 42 e 44 terão a altura esperada, mas apresentam um desvio de 2 bp a menos no tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação 394delTT.



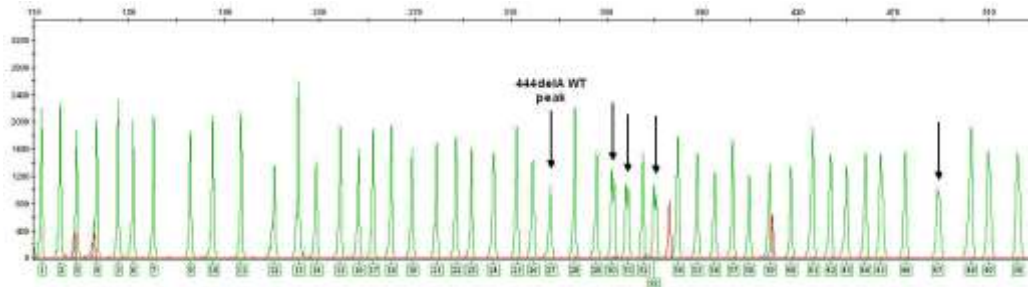
### F508del/CFTRdele2,3

São observadas alturas reduzidas dos picos nas posições 34 (394delTT), 35 (G85E WT), 41 (CFTRdele2,3 WT), 42 (P67L WT) e 44 (E60X WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação CFTRdele2,3. Os picos 34, 35, 41, 42 e 44 desaparecem dos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação CFTRdele2,3.

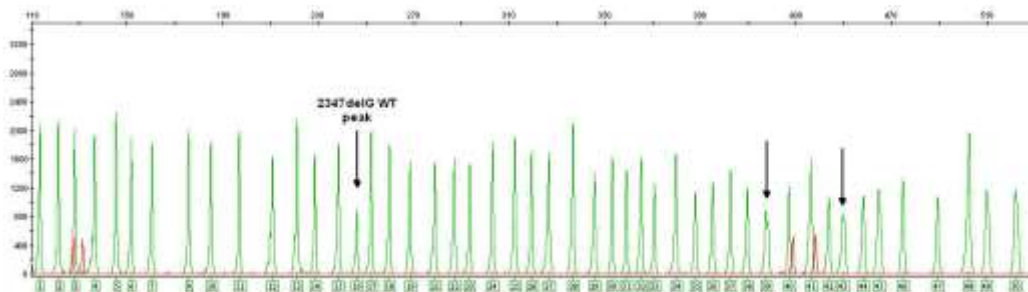


**444delA**

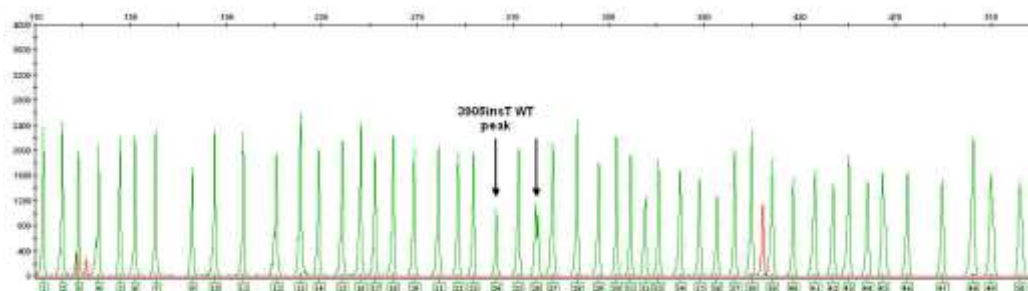
São observados dois picos com 1 bp de intervalo, nas posições 30 (R117H WT), 31 (R117C WT), 33 (Y122X WT) e 47 (621+1 WT), nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação 444delA. O pico 27 desaparece e os picos 30, 31, 33 e 47 terão a altura esperada, mas estão apresentando um desvio de 1 bp a menos no tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação 444delA.

**2347delG**

São observados dois picos com 1 bp de intervalo, nas posições 39 (2184delA WT) e 43 (2143delT WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para as mutações 2347delG. O pico 16 desaparece e os picos 39 e 43 terão a altura esperada, mas apresentam um desvio de 1 bp a menos no tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação 2347delG.

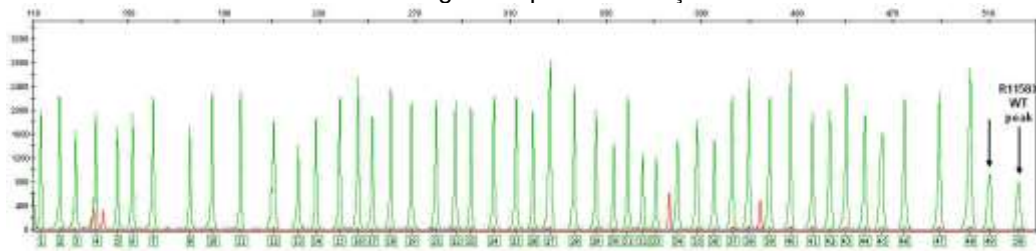
**3905insT**

São observados dois picos com 1 bp de intervalo, na posição 26 (S1251N WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação 3905insT. O pico 24 desaparece e o pico 26 terá a altura esperada, mas apresenta um desvio de 1 bp a mais do que o tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação 3905insT.

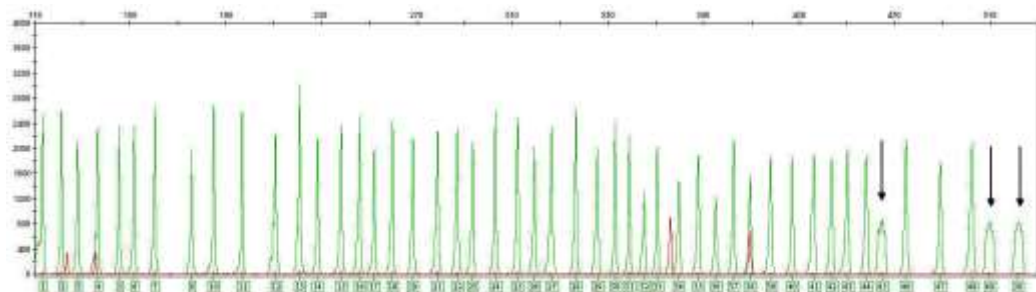


**R1158X**

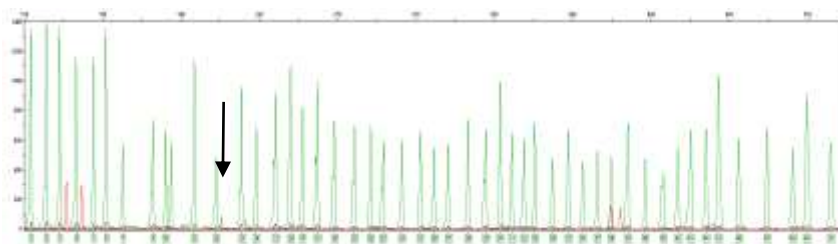
É observada uma altura do pico reduzida na posição 49 (R1162X WT) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para a mutação R1158X. O pico 49 desaparece dos resultados de indivíduos homozigóticos para a mutação R1158X.

**Polimorfismo rs4148721 (delAT) no intrão 22**

São observados dois picos com 2 bp de intervalo, nas posições 45 (3659delC WT), 49 (R1162X WT) e 50 (R1158X WT), nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para o polimorfismo rs4148721 (deleção de AT) no intrão 22. Os picos 45, 49 e 50 terão a altura esperada, mas apresentam um desvio de 2 bp a menos no tamanho esperado nos resultados de indivíduos homozigóticos para o polimorfismo rs4148721.

**Outras observações****V520F - Polimorfismo 1584G>A no exão 12**

Verificou-se que o polimorfismo 1584G>A interfere com a amplificação do mutante V520F e com a sequência de estirpe selvagem. É observada uma altura do pico reduzida na posição 12 (V520F) nos resultados da mistura B de indivíduos heterozigóticos para o polimorfismo 1584G>A. Na mistura B, o pico 12 desaparece dos resultados de indivíduos homozigóticos para polimorfismo 1584G>A. Um indivíduo que seja heterozigótico para a mutação F508del e também heterozigótico para a mutação 1584G>A exibe apenas um pico 12 na mistura B, em vez dos dois picos esperados na posição 12 que são normalmente observados num indivíduo heterozigótico F508del – veja o exemplo abaixo. O pico 12 desaparece da mistura A em indivíduos heterozigóticos para a mutação V520F e para o polimorfismo 1584G>A no mesmo alelo, embora tal resultado não tenha sido observado até à data e se considere uma combinação rara.



## Reactividade cruzada

Durante o desenvolvimento do teste, foram envidados todos os esforços para evitar a interferência no funcionamento do teste da presença de outros polimorfismos e mutações do gene CFTR descritos.

A mutação rara R1283M foi avaliada quanto à possibilidade de reacção cruzada e não foi detectada pelo kit Elucigene CF-EU2v1. Além disso, não foram detectados pelo teste os seguintes polimorfismos: 1655T/G (F508C), 1651A/G.

A avaliação de mutações e polimorfismos conhecidos do gene CFTR revelou os seguintes efeitos nos resultados do kit Elucigene CF-EU2v1:

1. O iniciador mutante G551D da mistura A também detecta a mutação S549RT>G. O software de análise rotula-a como pico 20. Não existe um pico de estirpe selvagem correspondente na mistura B.
2. O iniciador mutante 2184delA na mistura A faz reacção cruzada com a sequência de DNA do mutante 2183AA>G, o que resulta num pico mutante na posição 2184delA.
3. O iniciador mutante 1078delT na mistura A faz reacção cruzada com a sequência de DNA do mutante F316L, o que resulta num pico mutante na posição 1078delT.
4. O iniciador mutante R347P da mistura A faz reacção cruzada com a sequência de DNA do mutante R347H, o que resulta num pico mutante na posição R347P, cuja altura é menor do que a de um pico de R347P verdadeiro.
5. A presença do polimorfismo de F508C (1655T>G) resulta na redução da altura do pico I507del na mistura B de CF-EU2v1.
6. A presença de R117H resulta na redução da altura do pico R117C na mistura B de CF-EU2v1. Numa amostra homozigótica para R117H, o pico R117C está ausente.
7. A presença de G85E resulta na redução da altura do pico 394delTT na mistura B de CF-EU2v1. Numa amostra homozigótica para G85E, o pico 394delTT está ausente.
8. Por vezes, pode observar-se um pico de artefacto muito pequeno na posição I507del nos resultados de amostras heterozigóticas para F508del e, em particular, em amostras homozigóticas para F508del.
9. As mutações que se seguem, que não foram verificadas quanto a uma eventual reactividade cruzada por não estarem disponíveis amostras relevantes, podem interferir com o funcionamento do teste: R117P, R117L, 1717-2A>G, 621+2T>C, 621+2T>G, R553G, R553Q, R347L, I506T, I506S, I506V e a combinação rara de I507del com o polimorfismo 1651A/G.

## Características do desempenho

Realizou-se o teste ocultado de cento e dez amostras de DNA extraídas de sangue total líquido (EDTA) utilizando o Elucigene CF-EU2v1. Cinco amostras falharam após a PCR, o que esteve correlacionado com a baixa concentração de DNA (inferior a 1,5 ng/μl). Das que deram resultados interpretáveis, 96 foram normais, 5 foram heterozigóticas para F508del, 1 foi heterozigótica para 1717-1G>A, 1 foi heterozigótica para G551D, 1 foi heterozigótica para 621+1G>T, 1 foi heterozigótica para G542X e 1 foi heterozigótica composta para G542X/F508del.

Realizou-se o teste ocultado de noventa e um amostras de DNA extraído de gotas de sangue seco utilizando o Elucigene CF-EU2v1. A amplificação de cinco amostras falhou. Das amostras com amplificação bem-sucedida, 20 não cumpriram os critérios de análise para a interpretação, seguindo-se uma injeção de 12 segundos num analisador genético 3500; todas as amostras cuja amplificação falhou apresentaram correlação com concentrações baixas de DNA (menos de 1,5 ng/μl). As 20 amostras que falharam foram reinjectadas durante 36 segundos no analisador genético 3500 e analisadas; 7 amostras não chegaram a cumprir os critérios de análise para a interpretação. Das 79 amostras que deram resultados interpretáveis, 38 foram normais, 5 foram heterozigóticas para F508del, 3 foram heterozigóticas para G551D, 3 foram heterozigóticas para W1282X,

2 foram heterozigóticas para D1152H e 2 foram heterozigóticas para G542X. Foram ainda determinados quatro heterozigóticos compostos, 3120+1G>A/F508del, R117H/F508del, R1162X/F508del e R553X/F508del. Além disso, foram ainda observados numa única ocasião as seguintes amostras heterozigóticas: E60X, G85E, 394delTT, Y122X, 621+1G>T, 1078delT, R334W, R347P, A455E, I507del, 1717-1G>A, R553X, 1811+1.6kbA>G, 1898+1G>A, 2184delA, W846X, 3272-26A>G, Y1092X, 3659delC, 3849+10kbC>T, S1251N e N1303K.

Quarenta e seis amostras de DNA representantes de todas as 50 mutações detectadas pelo kit CF-EU2v1 foram amplificadas em cinco ocasiões distintas. Todas as amostras deram os resultados esperados, sem resultados negativos falsos ou positivos falsos, demonstrando especificidade e sensibilidade clínicas de 100%.

## Resolução de problemas

Estas instruções de utilização são disponibilizadas para garantir o melhor desempenho do ensaio. Os utilizadores não podem desviar-se dos procedimentos indicados. Qualquer desvio pode resultar num desempenho de nível inferior e originar dados de baixa qualidade. Mediante pedido, a Elucigene Diagnostics disponibiliza um Guia de resolução de problemas e fornece exemplos e soluções para algumas das observações mais comuns com o Elucigene CF-EU2v1, incluindo:

- Sem picos de diagnóstico ou STR
- Picos de diagnóstico ou STR fracos
- Picos demasiado altos (breakthrough peaks)/picos de fundo excessivos
- Picos não marcados
- Picos FAM (mutantes) fracos
- Perfil da mistura A desequilibrado
- Perfil da mistura B desequilibrado
- Picos divididos no perfil da mistura B

Para obter uma cópia do Guia de resolução de problemas do Elucigene CF-EU2v1, queira contactar o nosso grupo de assistência técnica:

T: +44 (0) 161 669 8122

F: +44 (0) 161 669 8129

E: [enquiries@elucigene.com](mailto:enquiries@elucigene.com)

E: [techsupport@elucigene.com](mailto:techsupport@elucigene.com)

## Limitações do procedimento

1. Os resultados obtidos com este ou com qualquer outro teste de diagnóstico devem ser utilizados e interpretados apenas no contexto do quadro clínico global. A Elucigene Diagnostics não é responsável por quaisquer decisões clínicas que sejam tomadas.
2. A ausência de detecção de mutações por este kit não constitui garantia de que não estejam presentes outras mutações do gene CFTR. É possível a existência de outras mutações não detectadas por este kit.
3. As mutações variam de frequência entre populações diferentes. Os dados de frequência das mutações nas populações estão disponíveis no The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (6).

O utilizador deste kit deve salientar estes aspectos quando reporta os resultados ao médico que efectua o diagnóstico/responsável pelo aconselhamento genético.

### **Exoneração de responsabilidade**

Os resultados deste e de outros ensaios de diagnóstico devem ser interpretados em conjunto com outros dados laboratoriais e clínicos de que o médico disponha.

Estes reagentes Elucigene são fornecidos para fins de diagnóstico in vitro.

Pode encontrar mais pormenores sobre a interpretação dos dados nos procedimentos do Guia de análise do software do Elucigene CF-EU2v1:

[www.elucigene.com/products](http://www.elucigene.com/products)

## Bibliografia

1. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998;132:589–95.
2. De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Simard F, Aubin G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet*. 1997;101:208–11
3. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353:1443–53
4. Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:816–21
5. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, and Tsui LC. "Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis." *Science* 1989; **245** (4922): 1073-8
6. Cystic Fibrosis Mutation Database, [www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app)
7. Joshua D. Groman et al. Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Is Pathogenic or Benign. *Am J Hum Genet*. 2004; 74(1): 176–179.
8. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).
10. PCR Primer: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition. ColdSpring Harbour Laboratory Press: Section 1

ELUCIGENE is a trademark of Delta Diagnostics (UK) Ltd.

ARMS é uma marca comercial registada da AstraZeneca UK Ltd. QIAAMP é uma marca comercial registada da Qiagen GmbH. PICOGREEN é uma marca comercial registada da Molecular Probes Inc. GENEMARKER é uma marca comercial registada da SoftGenetics Corporation. GENEMAPPER, NED, VIC, PET, POP-7, LIZ e HI-DI são marcas registadas da Life Technologies Corporation

### AVISO AO COMPRADOR: LICENÇA LIMITADA

Os polinucleóticos marcados com corantes VIC, NED e PET e/ou a sua utilização podem estar abrangidos por uma ou mais patentes detidas pela Life Technologies Corp. O preço de aquisição deste produto inclui os direitos limitados e não transmissíveis ao abrigo de determinadas reivindicações de certas patentes detidas pela Life Technologies Corp., para a utilização pelo comprador apenas desta quantidade do produto e exclusivamente em actividades de detecção de alvo(s) no domínio do diagnóstico humano. Não são transmitidos outros direitos. Podem obter-se mais informações acerca da aquisição de licenças relacionadas com os corantes atrás mencionados contactando o Director de Licenciamento. [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com).

Copyright © 2014 Delta Diagnostics (UK) Ltd.