



Elucigene® CF Iberian Panel

Instruções de utilização

Produto	Tamanho	Código de catálogo
Elucigene CF Iberian Panel	25 testes	CFIBNB1



Utilização em diagnóstico in vitro



Fabricado por:
Elucigene Diagnostics
Citylabs
Nelson Street
Manchester
M13 9NQ



Para Vendas, Assistência ao Cliente e Assistência Técnica:

T: +44 (0) 161 669 8122

F: +44 (0) 161 669 8129

E: enquiries@elucigene.com

E: 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 Iberian Panel

Utilização prevista

Para a detecção simultânea 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):

Nome de legado	De acordo com as orientações da HGVS *		Intrão/exão	
	cDNA name	Protein name	Intrão/exão de	Intrão/exão
712-1G>T	c.580-1G>T	-	Intrão 5	Intrão 5
H199Y	c.595C>T	p.His199Tyr	Exão 6a	Exão 6
P205S	c.613C>T	p.Pro205Ser	Exão 6a	Exão 6
V232D	c.695T>A	p.Val232Asp	Exão 6a	Exão 6
1609delCA	c.1477_1478delCA	p.Gln493ValfsX10	Exão 10	Exão 11
1812-1G>A	c.1680-1G>A	-	Intrão 11	Intrão 12
A561E	c.1682C>A	p.Ala561Glu	Exão 12	Exão 13
2184insA	c.2052_2053insA	p.Gln685ThrfsX4	Exão 13	Exão 14
R709X	c.2125C>T	p.Ara709X	Exão 13	Exão 14
K710X	c.2128A>T	p.Lys710X	Exão 13	Exão 14
2869insG	c.2737_2738insG	p.Tyr913X	Exão 15	Exão 17
A1006E	c.3017C>A	p.Ala1006Glu	Exão 17a	Exão 19

* 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 Elucigene CF Iberian Panel consegue distinguir entre indivíduos que são heterozigóticos e homozigóticos para todas as mutações e variantes acima.

Resumo e explicação

A fibrose cística (CF) 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 nem 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 Elucigene CF Iberian Panel foi concebido para prolongar a cobertura do Elucigene CF-EU2v1, especificamente para abordar as mutações mais comuns encontradas nas populações portuguesa e espanhola. O Elucigene CF Iberian Panel identifica 12 mutações adicionais no total.

Princípios do procedimento

O método utilizado pelo Elucigene CF Iberian Panel 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 (7). 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 Iberian Panel é um ensaio multifacetado que abrange uma reacção de PCR. Numa mistura de uma única reacção, tanto os alelos mutantes como os de estirpe selvagem são detectados para doze mutações dentro do gene CFTR. No ensaio CF Iberian Panel, os alelos mutantes são visualizados como picos de produtos de amplificação azuis e os alelos de estirpe selvagem são visualizados como picos de produtos de amplificação verdes. Os marcadores de controlo interno da amplificação (não associados a fibrose cística) que se encontram no CF-EU2v1 estão também incluídos na mistura CF Iberian Panel. Estes são visualizados sob a forma de picos de produtos de amplificação vermelhos e são usados para monitorizar a eficiência da amplificação das amostras e identificação de paciente auxiliar ao usar o CF Iberian Panel ao lado do ensaio Elucigene CF-EU2v1.

Advertências e precauções

1. O controlo de DNA fornecido com os kits foi analisado independentemente, 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 (HIV) 1 e 2.
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 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 bom 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 estirpe conhecida.
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



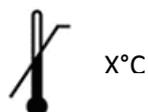
Fabricante



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

Cada kit contém:

Elucigene CF Iberian Panel (TA) (código da peça 450215): 1 x 120µl (25 testes), mistura de iniciadores contendo iniciadores para amplificar os seguintes alelos mutantes e estirpe selvagem A1006E, 1812-1G>A, A561E, 1069delCA, 2869insG, K710X, R709X, 2184insA, 712-1G>T, H199Y, P205S e V232D. Esta mistura também contém primários para a identificação de dois marcadores de microssatélites (short-tandem repeat, STR) hipervariáveis

Mistura principal para PCR (TM) (código da peça: 404480): 1 x ampola 400µl contendo DNA polimerase HotStart Taq e trifosfatos de desoxinucleótidos em tampão.

Controlo DNA (DC) (código da peça 40448): 1 x ampola de 50 µl de controlo de DNA a 6 ng/µl, normal para as mutações detectadas pelo Elucigene CF Iberian Panel.

Preparação e armazenamento do kit

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

Armazene os componentes a -20 °C e em ambiente escuro. Os corantes fluorescentes usados neste produto são fotossensíveis; minimize a exposição à luz.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Generalidades

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

Equipamento de laboratório – pipetas de precisão (2 conjuntos: 1 para utilizar antes da amplificação e 1 para depois da amplificação; preferencialmente pipetas de deslocamento positivo); vestuário de protecção, agitador vórtex; microcentrífuga; 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. O CF Iberian Panel foi validado e ficou demonstrado que desempenha especificação nas seguintes plataformas de termociclador recomendadas:

- Applied Biosystems GeneAmp 9700
- Applied Biosystems Veriti Dx (em modo standard)
- Applied Biosystems Veriti Dx (em modo de simulação 9700)
- Applied Biosystems Proflex (em modo standard)

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 Iberian foi desenvolvido no termociclador Applied Biosystems Veriti (em modo 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 Iberian Panel serem lançados.

Electroforese de capilares

Electroforese de capilares –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), padrão de tamanho GeneScan 600 LIZ (N.º Cat. ABI 4311320), 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)

Applied Biosystems ABI 3130 e analisadores genéticos 3500 (com software GeneMapper), matriz de capilares de 36 cm (matriz de capilares de 50 cm para analisador genético 3500), placas ópticas de 96 poços, septos de 96 poços, cassetes de 96 poços.

Análise de dados

É necessário um dos seguintes pacotes de software de análise de dados: GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems Inc.) ou mais recente, ou GeneMarker 1.65 (SoftGenetics LLC) ou mais recente.

Colheita e armazenamento de amostras

Efectuou-se a avaliação de amostras de DNA extraído de sangue total (EDTA) 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 (8). Recomenda-se que cada utilizador zele 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 200µl de água de pureza adequada a biologia molecular.

Concentração de DNA

Utilizando as condições de PCR e 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 com a quantidade de DNA de 15 ng. Porém, resultados interpretáveis são obtidos com uma quantidade de DNA de 5 ng a 30 ng.

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

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.

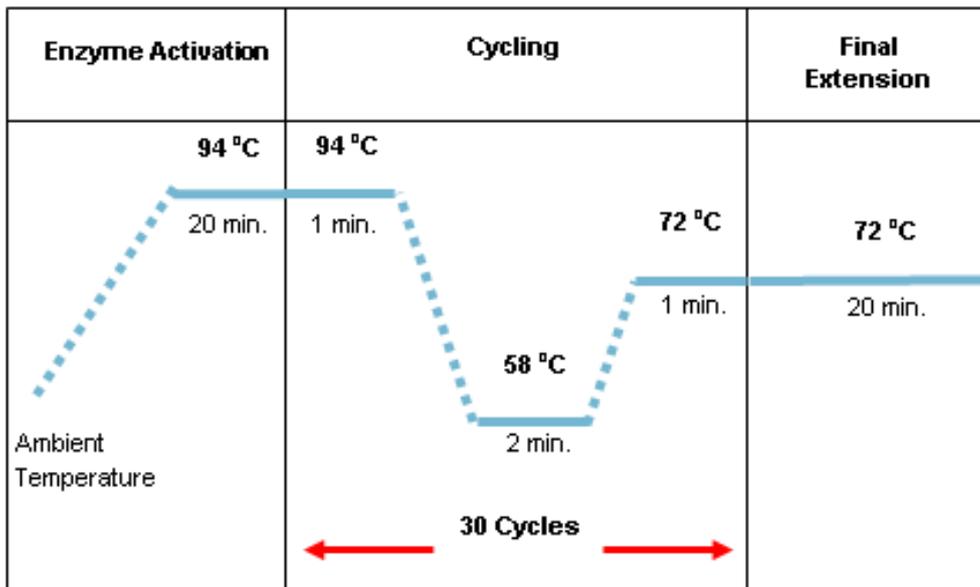
- Aumente o tempo de injeção – consulte a secção de electroforese de capilares.
- Volte a extrair a amostra de gotas de sangue seco e elua num volume reduzido (50µl) de água.

Protocolo do ensaio

Procedimento de amplificação

Nota: para minimizar o risco de contaminação, as etapas 3 - 5 têm de ser realizadas numa área isenta de DNA . Também devem ser realizadas etapas para evitar contaminação com produto PCR.

1. Programe o termociclador para um ciclo de etapa única para activar o DNA polimerase 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 (de água) em cada execução de PCR. Pode também ser considerado adequado incluir outros controlos, p. ex., controlos positivos (controlo DNA fornecido).
3. Descongele a mistura 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 nem componentes de lotes diferentes do kit CF Iberian Panel.

Tabela 1: Formulação da mistura de reacção

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

4. Pipete 10 μ l de cada mistura de reacção para o fundo de ampolas ou placas para PCR de 0,2 ml devidamente rotuladas.
5. Utilizando pontas de pipeta distintas, adicione 2,5 μ l 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 μ l de água desionizada esterilizada.
6. Centrifugue um pouco as ampolas até que todo o líquido esteja no fundo de cada ampola.
7. Coloque firmemente todas as ampolas no bloco do termociclador. Inicie o programa de activação de 94°C, seguido do programa de amplificação (ver passo 1).
8. Concluído o programa de amplificação, as amostras podem ser armazenadas durante a noite à temperatura ambiente ou a 2 °C – 8 °C, durante 7 dias, até à análise por electroforese de capilares.

Electroforese de capilares

Recomenda-se que cada utilizador zele 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. 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 num Genetic Analyzer de ABI3130 ou ABI3500.

1. Combine 6,8 µl de padrão de tamanho com 250 µl de formamida Hi-Di e misture bem (mistura suficiente para 16 poços). Distribua 15 µl da mistura pelo úmero necessário de poços de uma placa óptica de 96 poços.
2. Adicione 3 µl de produto de PCR de amostra à mistura padrão (da etapa 1) já distribuído na placa e misture com a pipeta. Sele a 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 a placa a 1000 g por 10 segundos, remova eventuais bolhas existentes nos poços e carregue para o analisador genético.

Nota: É essencial que poços não utilizados (ou seja, poços nos quais não esteja carregada uma amostra de DNA) ainda estejam carregados com formamida Hi-Di para garantir que os capilares não secam.

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 de injeção. Inversamente, pode aplicar-se mais produto de amplificação à coluna para análise aumentando o tempo de injeção. Amostras previamente amplificadas podem ser reinjectadas diversas vezes para reanálise.

Análise de dados pós-PCR

ANALISADOR GENÉTICO ABI3130

O CF Iberian Panel foi concebido para ser compatível com o produto Elucigene CFEU2v1. Como tal, o CF Iberian Panel pode ser realizado usando módulos de execução e definições CFEU2v1. Alternativamente, um módulo de execução separado CF Iberian pode ser criado pelo utilizador da seguinte maneira.

Crie uma ficha de amostras usando o software de recolha de dados 3130 com as seguintes definições:

- Nome da amostra: tem de ser o mesmo nome ou número específico da amostra.
- Proprietário da execução: seleccione ou proprietário padrão para o laboratório.
- Protocolo de execução: CF_Iberian (contém módulo de execução 3130)*.

**Nota: é necessário criar um módulo de execução com detalhes das definições de instrumento e, posteriormente, atribuir este a um protocolo de execução em que o conjunto de corantes G5 foi seleccionado. Para mais informações acerca da criação de módulos de execução, queira consultar o manual de utilização do instrumento.*

MÓDULO DE EXECUÇÃO 3130**PARA POLÍMERO POP7**

Módulo de capilares de 36 cm: MFI

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

- Tipo: Regular
- Template (Modelo): FragmentAnalysis36_POP7
- Insira as definições descritas na tabela abaixo:

#	Nome do parâmetro	Valor	Gama
1	Oven Temperature	60	int 18...65 °C
2	Poly_Fill_Vol.	6500	6500...38000 etapas
3	Current Stability	5,0	int 0...2000 uA
4	PreRun_Voltage	15.0	0...15 kvolts
5	Pre_Run_Time	180	1...1000 s
6	Injection_Voltage	3,0	1...15 kvolts
7	Injection_Time	12.0	1...600 s
8	Voltage_Number_Of_Step	20	1...100 nk
9	Voltage_Step_Interval	15	1...60 s
10	Data_Delay_Time	60	1...3600 s
11	Run_Voltage	15.0	0...15 kvolts
12	Run_Time	1200	300...14000 s

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 Iberian Panel no Protocol Manager (gestor de protocolos) e assegure-se de que selecciona as seguintes características:

- Tipo: Regular
- Run Module (Módulo de execução): CF_Iberian (ver modulo de execução acima)
- 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 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.

ANALISADOR GENÉTICO ABI3500

Precisa de ser criado um Instrument Protocol que possa então ser usado para o CF Iberian Panel e o CF-EU2v1.

Crie o Instrument Protocol (protocolo do instrumento) 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:

Application Type: Capillary Length: cm Polymer:

Dye Set:

Instrument Protocol Properties

* Run Module:

* Protocol Name:

Description:

Oven Temperature (°C): Run Voltage (kVolts): PreRun Voltage (kVolts): Injection Voltage (kVolts):

Run Time (sec.): PreRun Time (sec.): Injection Time (sec.): Data Delay (sec.):

▶ Advanced Options

Close Save

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.

Análise e interpretação de resultados

Interpretação geral dos resultados

Os produtos de PCR são observados como um sistema marcado de cinco corantes, usando o conjunto de filtros G5. O conjunto de filtros G5 detecta os fragmentos marcados 6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarelo) e PET (vermelho) mais o marcador de padrão de tamanho com LIZ (laranja) numa electroforese e no programa GeneMapper ou GeneMarker.

Nota importante: diferentes combinações de instrumento, polímero e padrão de tamanho podem fazer com que o "size calling" varie ligeiramente. Durante a validação do kit, os utilizadores deverão verificar se as definições padrão de "bin" resultam em marcação de picos precisa e, caso necessário, ajustá-las. Em caso de dificuldades, entre em contacto com a Assistência Técnica (techsupport@elucigene.com).

Guia de análise geral para o CF Iberian Panel

No CF Iberian Panel, tanto os primários específicos mutantes como a estirpe selvagem são combinados na mesma mistura. A presença de uma mutação CF é identificada pela presença de um pico azul e a presença de um alelo de estirpe selvagem (normal) é identificada pela presença de um pico verde.

Os indivíduos que sejam portadores de uma cópia mutante e uma cópia de estirpe selvagem (heterozigótico) de um alelo específico mostrarão um pico azul e um verde para esse alelo.

Os indivíduos que sejam portadores de cópias mutantes de um alelo específico (mutante homozigótico) mostrarão um único pico azul para esse alelo.

Os indivíduos que sejam portadores de duas cópias de estirpe selvagem de um alelo específico (estirpe selvagem homozigótica) mostrarão um único pico verde para esse alelo.

São incluídos marcadores STR hipervariáveis (vermelhos) nesta mistura. Estes marcadores STR são os mesmos que os incluídos nas misturas CF-EU2v1 A e B, o que possibilita a comparação entre amostras de pacientes com o CF Iberian Panel e as misturas CF-EU2v1 A e B. Isto ajuda a reduzir o potencial para confusão de amostras porque um perfil de STR diferente em qualquer das três misturas indica isso mesmo. 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.

Marcadores detectados

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

Marcadores detectados

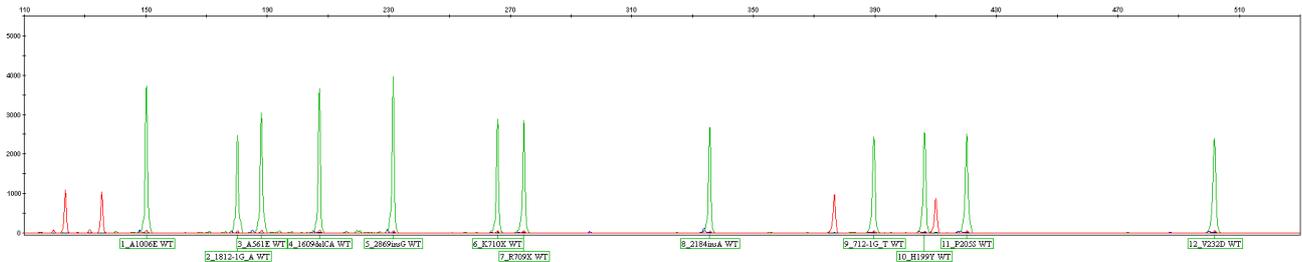
Marcador (N.º Pico)	Marcador	Produto bp Tamanho Intervalo (dados 3130/POP7)
01	A1006E	145-154
02	1812-1G>A	175-182.5
03	A561E	183-191
04	1609delCA	198-213
05	2869insG	228-233
06	K710X	261-268
07	R709X	270-277
08	2184insA	332-338
09	712-1G>T	383-395
10	H199Y	400-408
11	P205S	415-423
12	V232D	496-505

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

Exemplos de interpretação

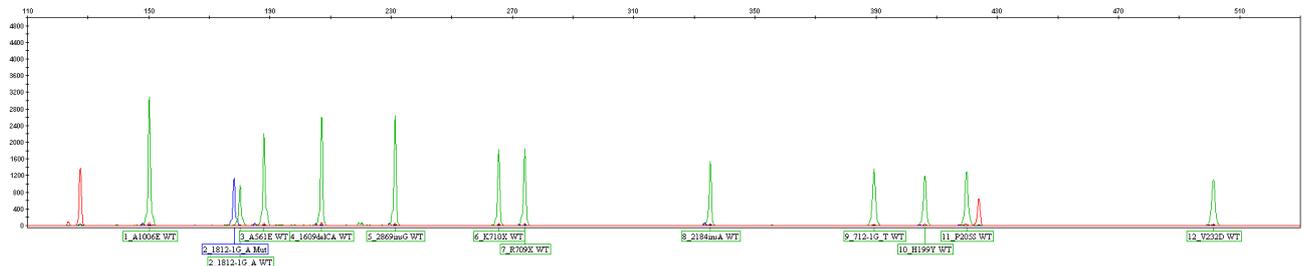
Resultado normal

Num resultado normal, todos os alelos detectados são homocigóticos estirpe selvagem, o que é indicado pela presença de picos verdes únicos marcados para todos os 12 marcadores. Os marcadores STR não devem ser marcados e o tamanho/padrão do marcador deve estar de acordo com o tamanho/padrão do marcador das misturas CF-EU2v1 A e B para uma dada amostra. Abaixo encontra-se um exemplo de um resultado normal.



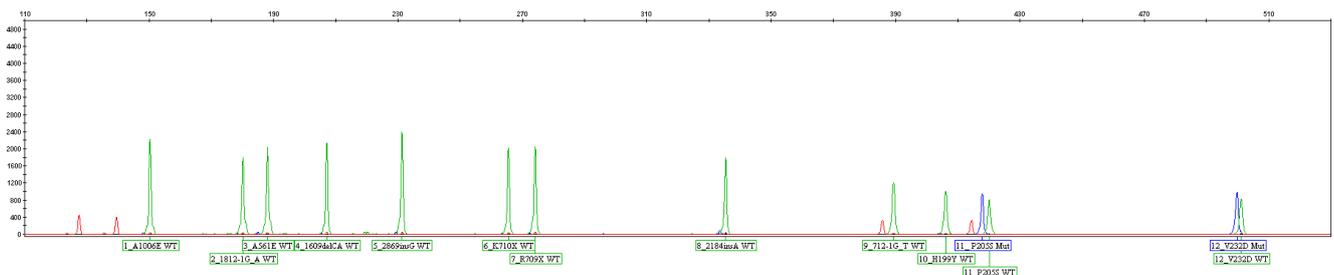
Mutação heterozigótica

O exemplo abaixo indicada um heterozigótico 1812-1G>A. O alelo mutante 1812-1G>A é indicado pelo pico azul marcado à esquerda do alelo A1006E de estirpe selvagem (pico verde marcado). Em qualquer caso, os picos (azuis) mutantes devem ser localizados à esquerda da estirpe selvagem (verde).



Heterozigótico composto

O exemplo abaixo apresenta um resultado de um heterozigótico composto para as mutações P205S e V232D. Os alelos mutantes P205S e V232D são indicados pelos picos azuis marcados à esquerda dos respectivos picos de alelos de estirpe selvagem (pico verde marcado).



Inserções e deleções

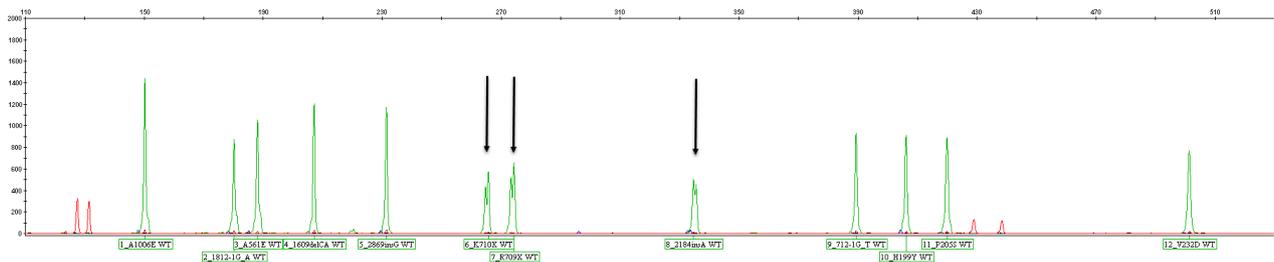
Devido à natureza do desenho do Elucigene CF Iberian Panel, a presença de inserções ou deleções entre dois iniciadores opostos resulta em variações do tamanho da totalidade dos produtos de amplificação produzidos entre estes dois iniciadores. Por conseguinte, além das 12 mutações detectadas pelo Elucigene CF Iberian Panel, quaisquer inserções e deleções no interior das sequências alvo amplificadas podem ser detectadas através da variação do tamanho esperado do produto de amplificação dos picos de estirpe selvagem (verde). Estes foram descritos na **Tabela de inserções e deleções**, disponível a partir da página da Elucigene:

<http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/>

2347delG é um exemplo de uma deleção detectada pelo ensaio Elucigene CF-EU2v1, que tem impacto sobre os picos (verdes) de estirpe selvagem do exão 14 do perfil do ensaio CF Iberian, como demonstrado em seguida:

2347delG

São observados dois picos com 1 bp de intervalo para a estirpe selvagem (verde) pico 6 (K710X), pico 7 (R709X) e pico 8 (2184insA) num heterozigótico individual para a mutação 2347delG (ver perfil abaixo). A presença da mutação 2347delG será confirmada se usar o ensaio CF-EU2v1 (indicado como o pico azul na posição 16, na mistura A de CF-EU2v1).



Outras observações

Interação H199Y e P205S

Verificou-se que a mutação P205S interfere parcialmente com a amplificação da sequência de iniciadores de estirpe selvagem H199Y. A altura reduzida da estirpe selvagem pico 10 (H199Y) pode ser observada num heterozigótico individual para a mutação P205S.

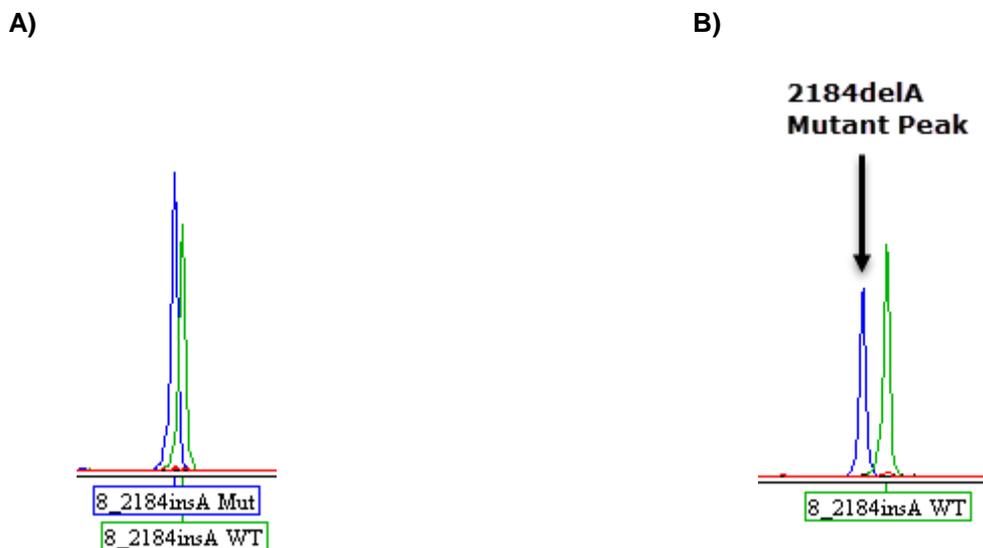
Reactividade cruzada

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 avaliação de mutações e polimorfismos conhecidos do gene CFTR revelou os seguintes efeitos nos resultados do Elucigene CF Iberian Panel:

2184delA

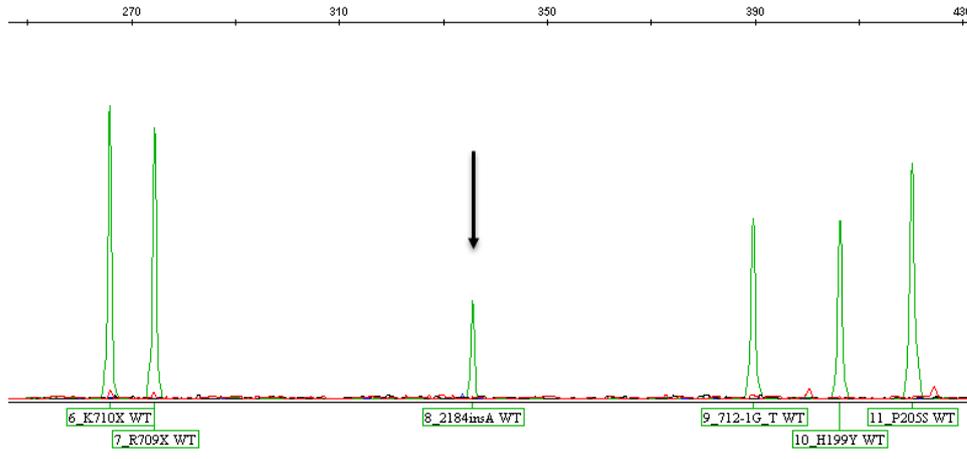
O primário mutante 2184insA irá detectar a mutação 2184delA. As mutações 2184insA e 2184delA podem ser distinguidas com base na diferença de tamanho do produto de amplificação de 2 bp. A distinção entre estas mutações é apresentada nos diagramas A e B, em baixo:



- A) O produto de amplificação mutante 2184insA é do mesmo tamanho que o produto de amplificação de estirpe selvagem e é apresentado como um pico azul **marcado**, sobrepondo significativamente o pico de estirpe selvagem, como mostrado em cima.
- B) O produto de amplificação mutante 2184delA é 2 bp mais pequeno do que o produto de amplificação de estirpe selvagem e é apresentado como um pico azul **não marcado**, o que não é incluído na gama do "bin" do painel 2184insA.

2183AA>G

O iniciador de estirpe selvagem 2184insA não amplificará os alelos que contiverem a mutação 2183AA>G, traduzindo-se no desaparecimento do pico 2184insA de estirpe selvagem. O exemplo abaixo mostra o pico de estirpe selvagem 2184insA de meia intensidade, na presença de um heterozigótico 2183AA>G.



Nota: Na presença de um homozigótico 2183AA>G, espera-se que o pico de estirpe selvagem 2184insA desapareça completamente devido à ausência de amplificação de qualquer dos alelos. Se isto ocorrer, recomenda-se a realização de estudos de seguimento para testar a presença de 2183AA>G.

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: G194R, G194V, H199R, H199Q, P205R, L233F, Q493X, Q493P, Q493R, 1612delTT, R560S, 1813insC, R709Q, 2868G>A, S912L, S912X, I1005R. A lista não é exclusiva nem completa.

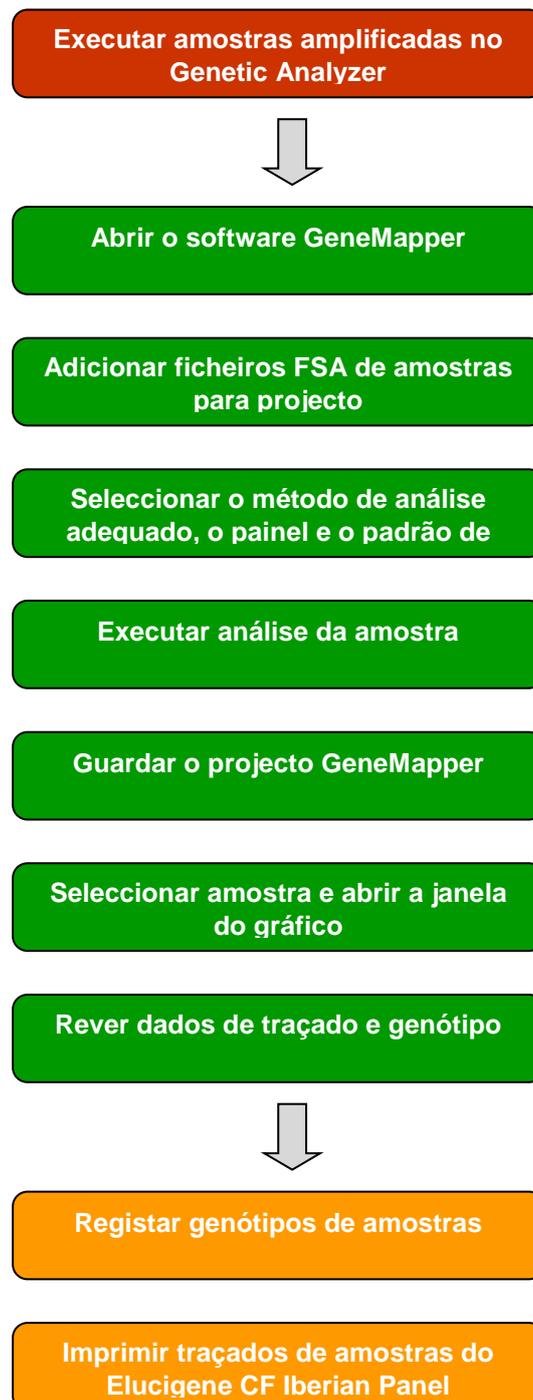
Guia de análise do software do GeneMapper

Introdução

A secção que se segue descreve os procedimentos para análise de amostra dos resultados do Elucigene CF-Iberian Panel usando pacotes de software Applied Biosystems GeneMapper (versão 3.7 ou mais recente). Nota: os screenshots deste documento foram tirados do GeneMapper v5.

Processo de análise

O processo para análise de amostras foi resumido no diagrama abaixo:



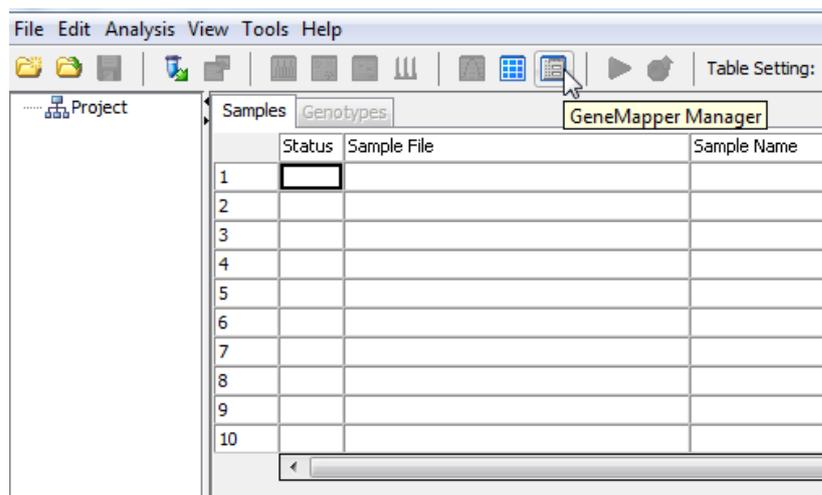
Importar as definições para análise do CF Iberian Panel GeneMapper

Antes da primeira utilização do kit, é necessário importar as definições do CF Iberian Panel para GeneMapper. O processo é controlado através da interface **GeneMapper Manager**. As definições do GeneMapper do CF Iberian Panel estão disponíveis na página da Elucigene:

<http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/>

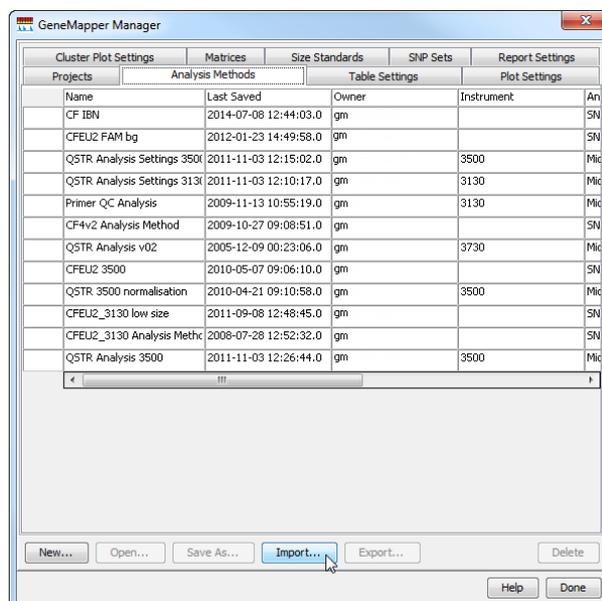
1. Abra o **GeneMapper Manager** clicando no ícone  (Figura 1).

Figura 1: Abrir o GeneMapper Manager



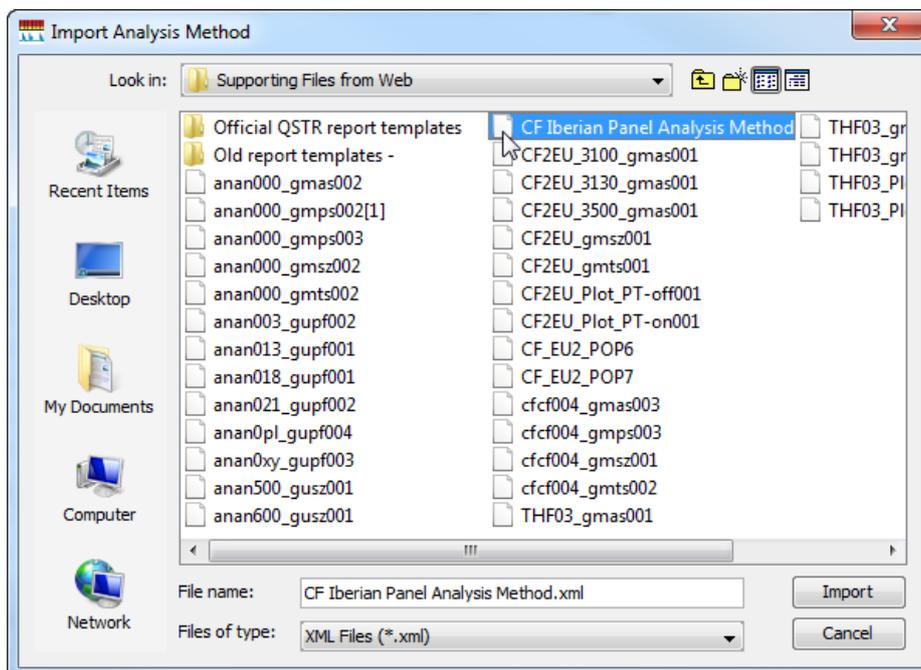
2. Seleccione o separador **Analysis Methods** e depois clique no botão de importação (Figura 2).

Figura 2: Interface do GeneMapper Manager



- Navegue para e importe o método de análise do CF Iberian Panel (3130 ou 3500) (Figura 3).

Figura 3: Importar métodos de análise



- Repita o processo, seleccionando o separador adequado e importando o ficheiro correspondente para:
 - Definições de tabela
 - Definições de gráfico
 - Padrão de tamanho

Nota: as definições de tabela, as definições de gráfico e o padrão de tamanho são as mesmas que as usadas no CF-EU2v1. Os operadores que actualmente usem o CF-EU2v1 podem aplicar estas definições sem importar.

Importar o bin do produto CF Iberian e os ficheiros do painel para o Panel Manager

Antes da primeira utilização do kit, é necessário importar o bin do produto CF Iberian e os ficheiros do painel para o GeneMapper. Este processo é controlado através da interface **Panel Manager**.

O bin e os ficheiros do painel do GeneMapper do CF Iberian estão disponíveis na página da Elucigene:

<http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/>

1. Abra o Panel Manager Program clicando no ícone .
2. Clique em **Panel Manager**, na janela de navegação da esquerda. O Panel Manager aparecerá agora realçado a azul.
3. Seleccione **File/Import Panels**. Navegue para e importe o painel do GeneMapper **CF Iberian GeneMapper Panel File.txt** (Figura 4).
4. O ficheiro do painel será agora apresentado na janela de navegação da esquerda. Clique no ficheiro do painel, garantindo que está realçado a azul.
5. Seleccione **File/Import Bin Set**. Navegue para e importe o ficheiro do bin GeneMapper **CF Iberian GeneMapper Bin File.txt** (Figura 5).
6. Clique em **Apply** e em **OK** para aplicar.

Figura 4: Importar o ficheiro do painel CF Iberian

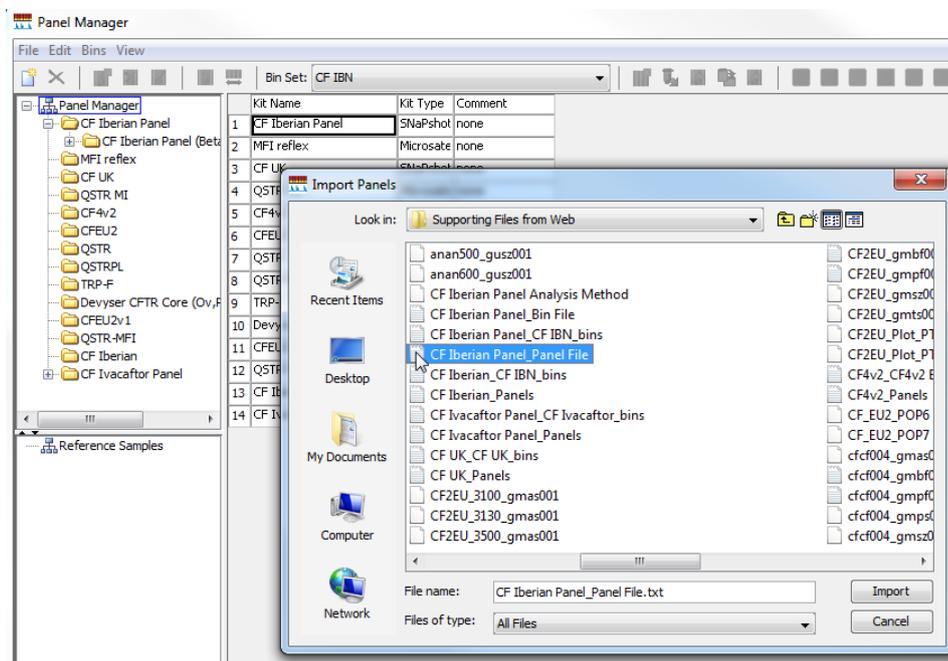
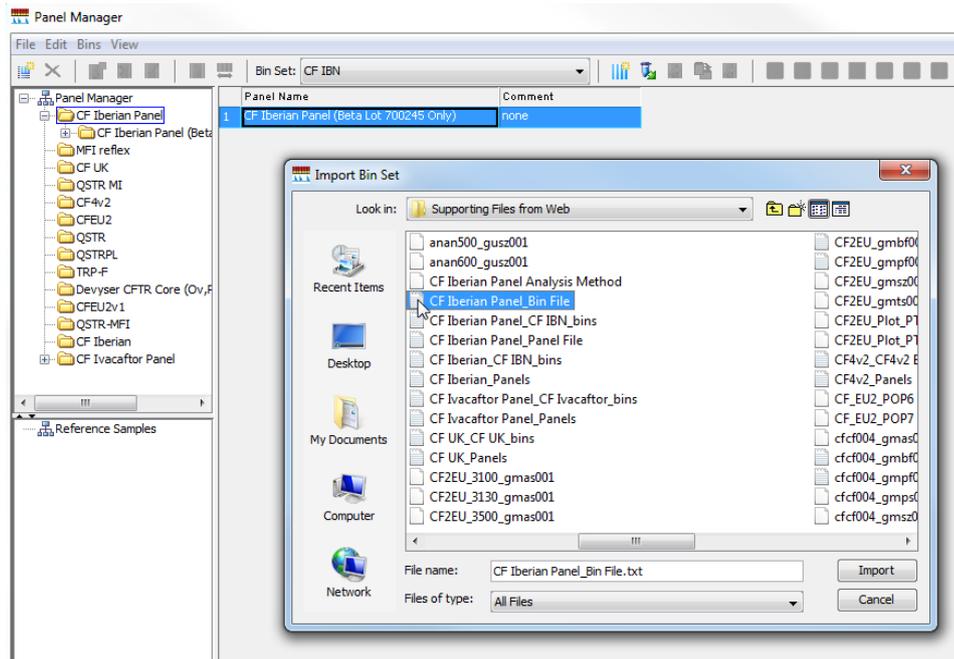


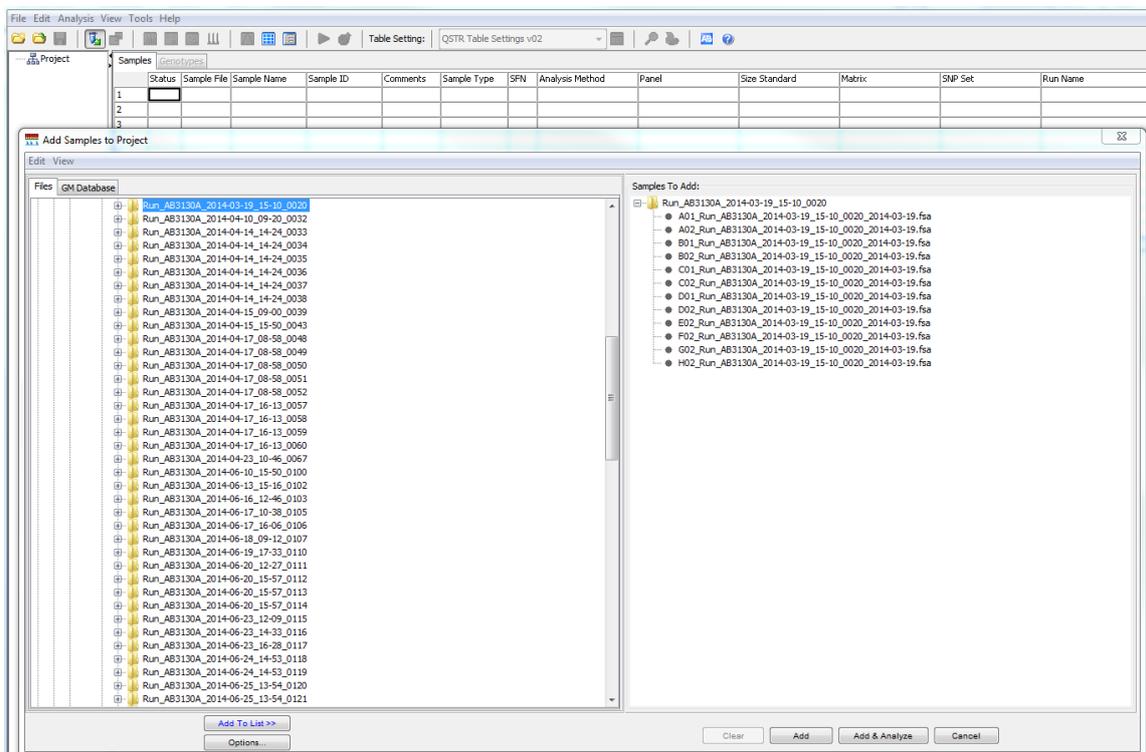
Figura 5: Importar o ficheiro do bin CF Iberian



Importar os ficheiros de dados não tratados do CF Iberian Panel para o GeneMapper

1. Abra o ficheiro do programa GeneMapper.
2. Clique em  para adicionar ficheiros de dados a um novo projecto. Navegue para o local onde os ficheiros de dados não tratados .fsa estão guardados, realce os ficheiros de dados adequados e clique no botão Add to List>> para adicionar.
3. A pasta de execução aparecerá agora na janela Samples to Add. Um duplo clique no ícone da pasta de execução nesta janela mostrará cada ficheiros .fsa a importar. As amostras são então adicionadas clicando em  no fundo do ecrã. Os ficheiros de dados aparecerão agora ecrã principal do GeneMapper (Figura 6)

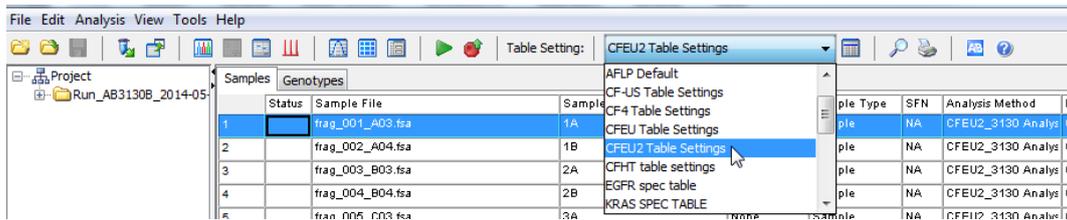
Figura 6: Amostras foram adicionadas à lista e estão prontas para ser adicionadas ao projecto.



Análise e determinação do genótipo de ficheiros de dados não tratados do CF Iberian Panel importado

1. Na principal janela GeneMapper, seleccione as **CFEU2 Table Settings** da forma apresentada (Figura 7).

Figura 7: Selecção das definições da tabela



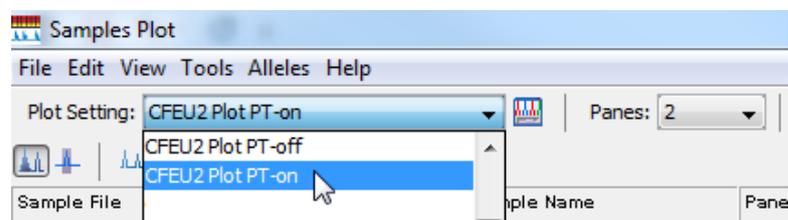
2. Na janela principal do GeneMapper, seleccione a primeira célula no **Analysis Method** e seleccione o método de análise adequado a partir do menu pendente: **Método de análise do CF Iberian Panel (3130 ou 3500)**.
3. Repita este processo para o **Panel**, seleccionando o **CF Iberian Panel** e, da mesma forma para o **Size Standard**, seleccionando **CFEU2 size standard** a partir dos menus pendentes.
4. Clique em  para iniciar a análise da amostra. Atribua um nome de projecto quando tal for solicitado.

Rever dados de traçado e genótipo do CF Iberian Panel

1. Selecciona a amostra para análise (realce a linha da amostra).
2. Clique em  para **Display Plot (mostrar o gráfico)**.
3. Use o menu pendente para seleccionar as definições de gráfico CF-EU2v1 certas (Figura 8).

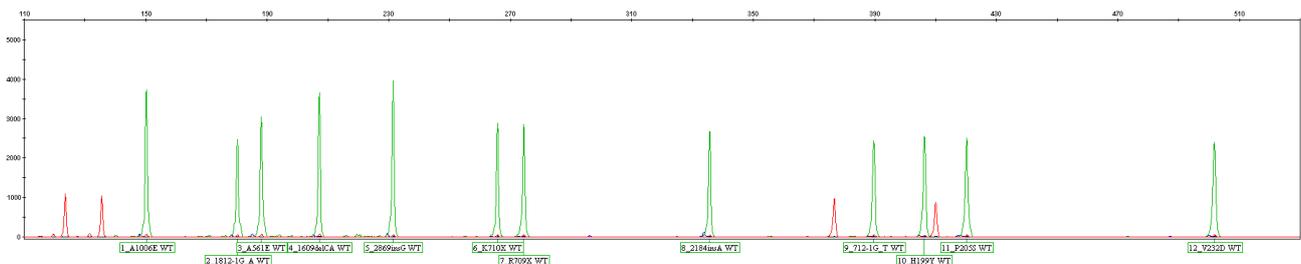
Nota: se analisar os dados do CF Iberian Panel lado a lado com os dados do CF-EU2v1, verá que o CF Iberian Panel é compatível com as definições de **CFEU2v1 Plot PT-on (ligado)** e **CFEU2v1 Plot PT-off (desligado)**.

Figura 8: Use o menu pendente para seleccionar as definições de gráfico CFEU2



4. A janela do gráfico apresentará dados de traçados de amostras (Figura 9).
5. Recomenda-se que a janela do gráfico tenha **Single click editing** activado. Para o fazer, seleccione **Alelos/set click editing** e certifique-se de que esta opção está seleccionada.

Figura 9: Janela do gráfico da amostra do CF Iberian Panel apresentando dados de traçados marcados



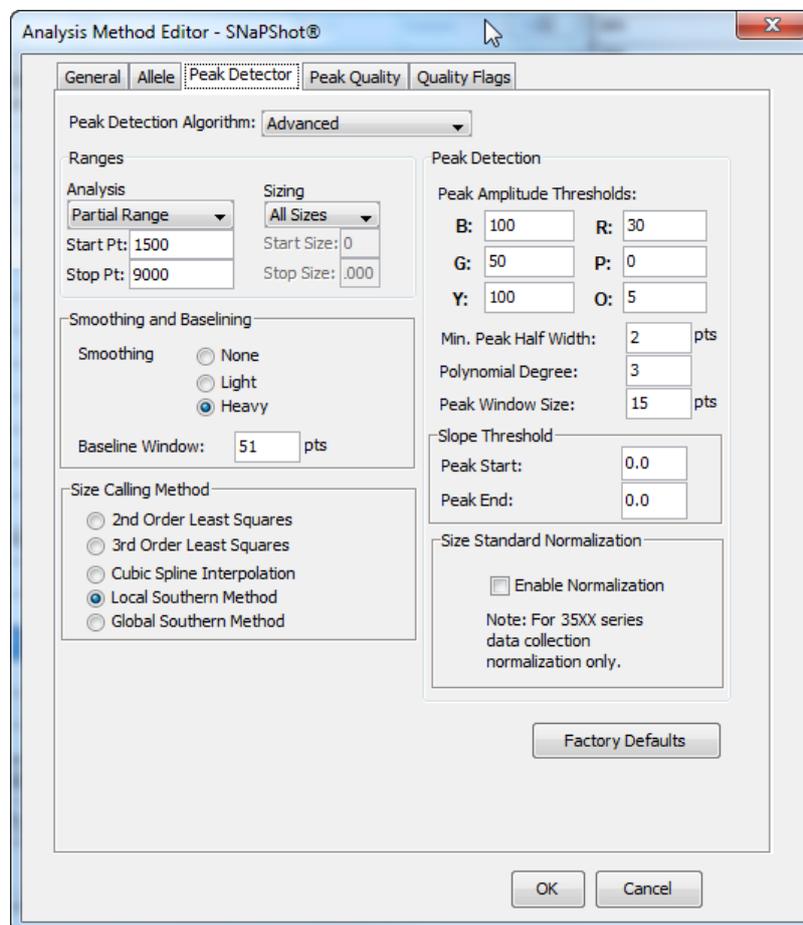
Modificar o ficheiro de parâmetros de análise

Pode ser necessário modificar as gamas de análise **Analysis Ranges** nas definições de método de análise do CF Iberian Panel para responder pelas suas condições de execução. A gama de análise mínima irá depender do capilar e polímero usados durante a recolha de dados.

Para visualizar as actuais definições de análise:

1. Abra o **GeneMapper Manager** clicando no ícone .
2. Seleccione o separador **Analysis Methods**. O ficheiro importado do CF Iberian Panel será listado como **CF Iberian Panel Analysis Method**.
3. Clique no **CF Iberian Panel Analysis Method**. A fila abrir-se-á realçada.
4. Clique no botão **Open** pra abrir e seleccione o **Peak Detector** (Figura 10).

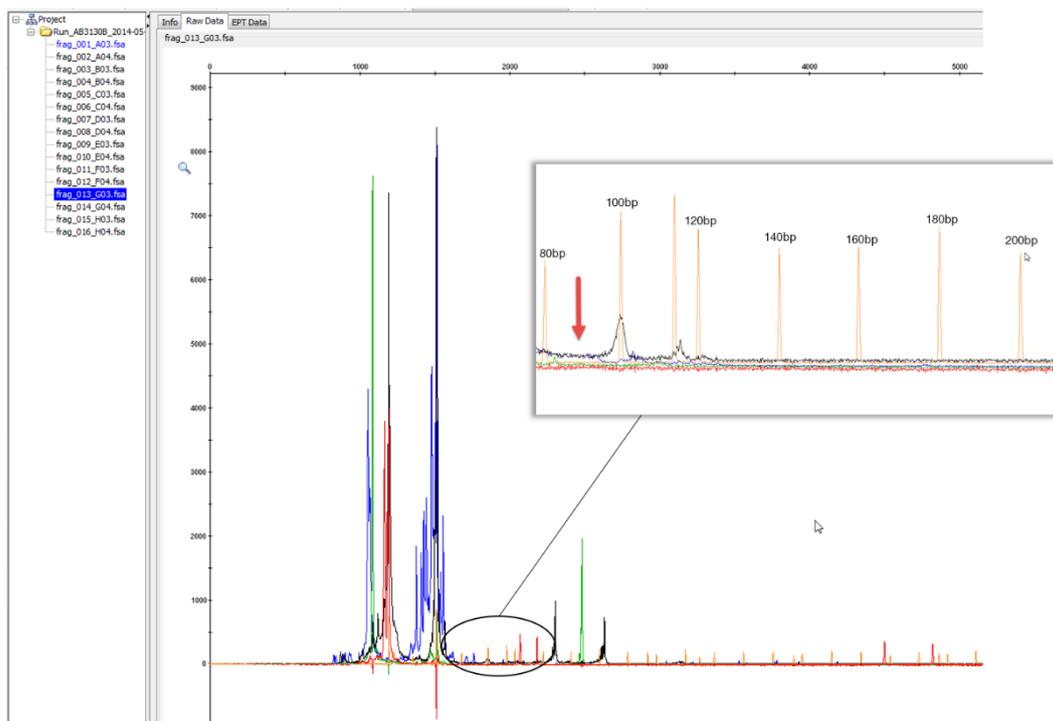
Figura 10: Gamas de análise



Para encontrar a gama de análise certa para o seu laboratório:

1. A partir da janela principal do GeneMapper, faça duplo clique na pasta de execução importada para ver a lista de ficheiros .fsa que contém.
2. Seleccione um ficheiro .fsa.
3. Clique no separador Raw data apresentará o electroforograma de dados não tratados.
4. Usando o pico LIZ GS600v2 de 100 bp (laranja) como guia, decida-se por um ponto de dados aproximadamente 100 pontos de dados mais pequeno (Figura 11).
5. Garanta que a gama de análise máxima abrange o maior pico do padrão de tamanho (600 para GS600LIZv2).
6. Introduza os novos valores no ficheiro de análise (accedendo da forma descrita em cima).

Figura 11: Encontrar a gama mínima usando os dados não tratados da amostra



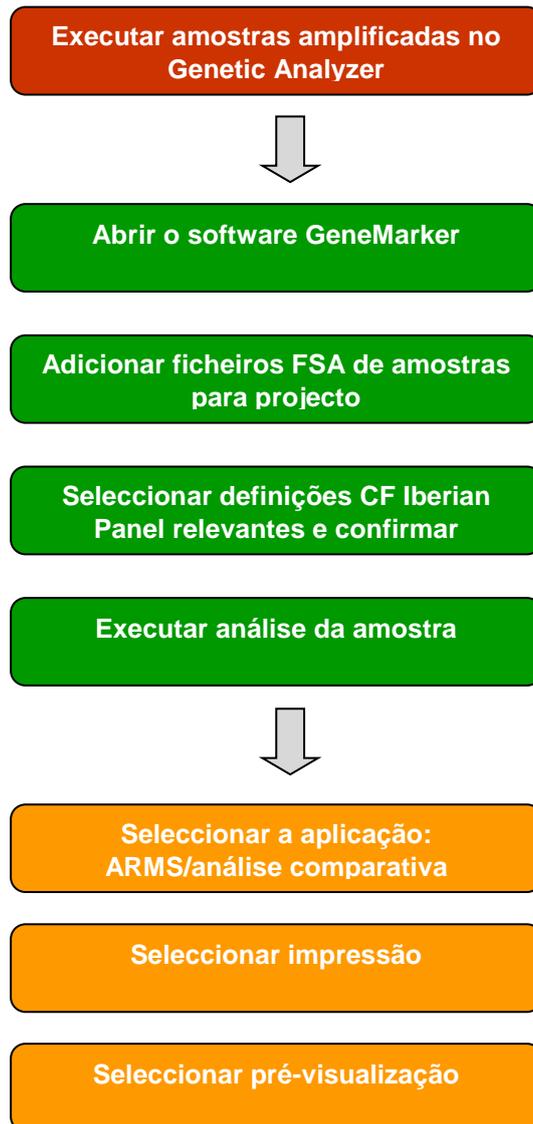
Guia de análise do GeneMarker

Introdução

A secção que se segue descreve os procedimentos para análise de amostra dos resultados do Elucigene CF-Iberian Panel usando o pacote de software SoftGenetics GeneMarker (versão 1.95 ou mais recente). Nota: os screenshots deste documento são tirados do GeneMarker v 2.6.3.

Processo de análise

O processo para análise de amostras foi resumido no diagrama abaixo:



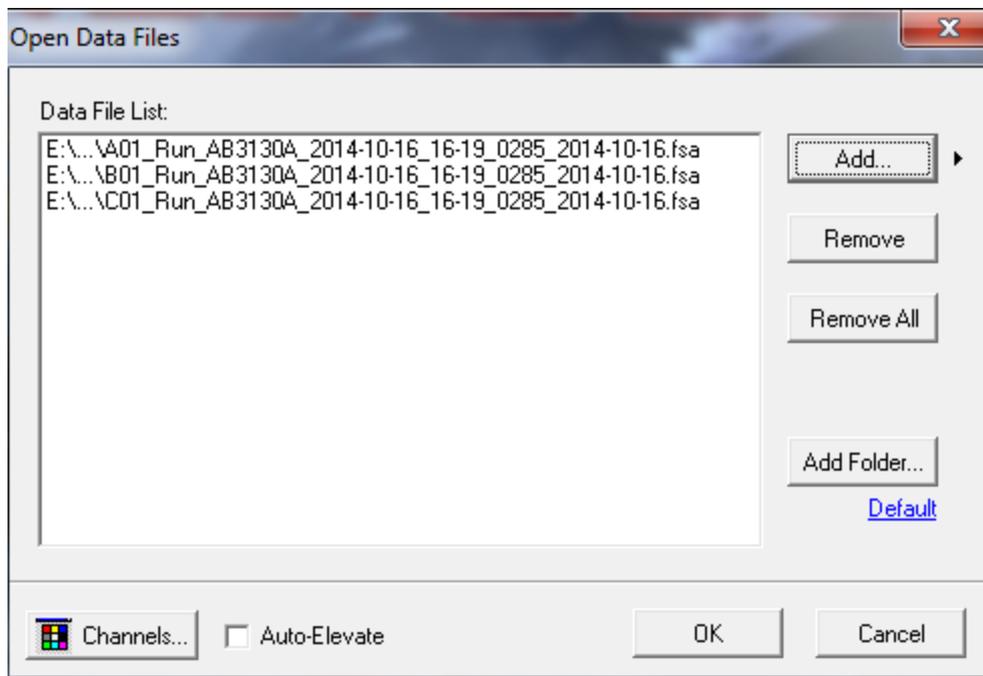
Adicionar ficheiros de amostras ao GeneMarker

Abra o ficheiro de programa GeneMarker e, quando solicitado, seleccione **Open Data**. A caixa Open Data Files surgirá.

Clique no botão **Add**. Abre-se a caixa de diálogo Open. Navegue para o directório que contiver ficheiros de dados não tratados;

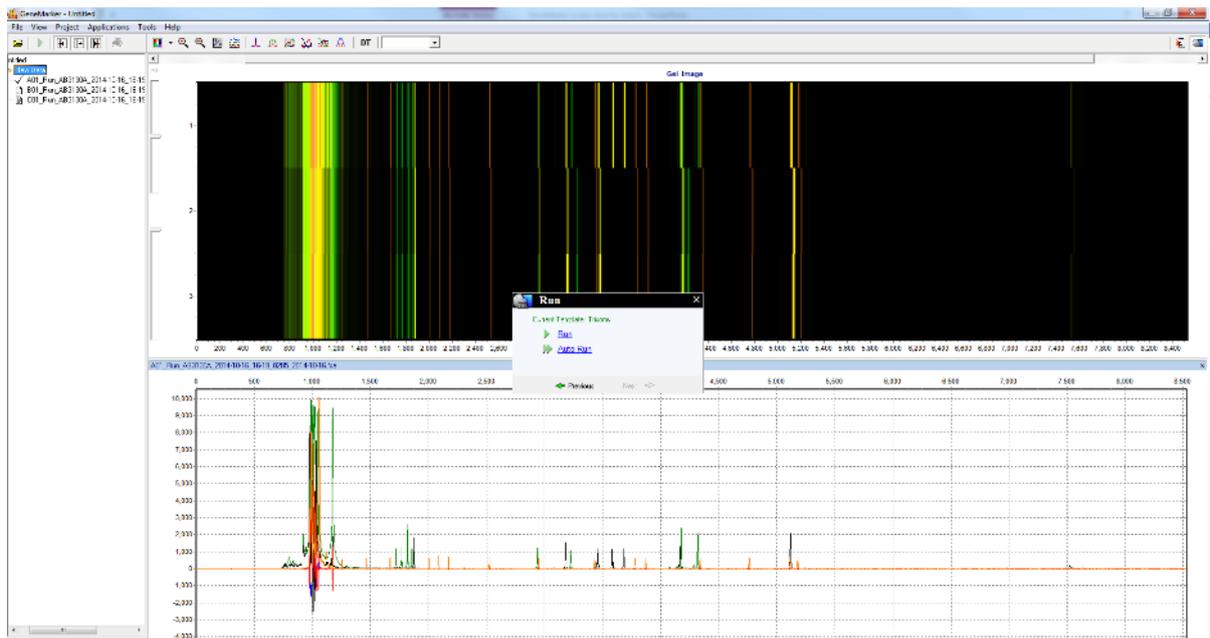
1. Seleccione todos os ficheiros com CTRL+A ou use as teclas CTRL e/ou SHIFT para seleccionar amostras individuais.
2. Clique no botão **Open** (abrir) da caixa de diálogo com o mesmo nome. Os ficheiros seleccionados surgirãõ listados no campo Data File List (Figura 12).

Figura 12: Amostras adicionadas à lista Data File.



3. Clique no botão **OK** da caixa de diálogo Open Data Files e as amostras serão carregadas para o GeneMarker. O software abrirá automaticamente a janela Raw Data Analysis (Figura 13).

Figura 13: Janela de análise de dados não tratados



Importar as definições de painel para o GeneMarker do CF Iberian Panel

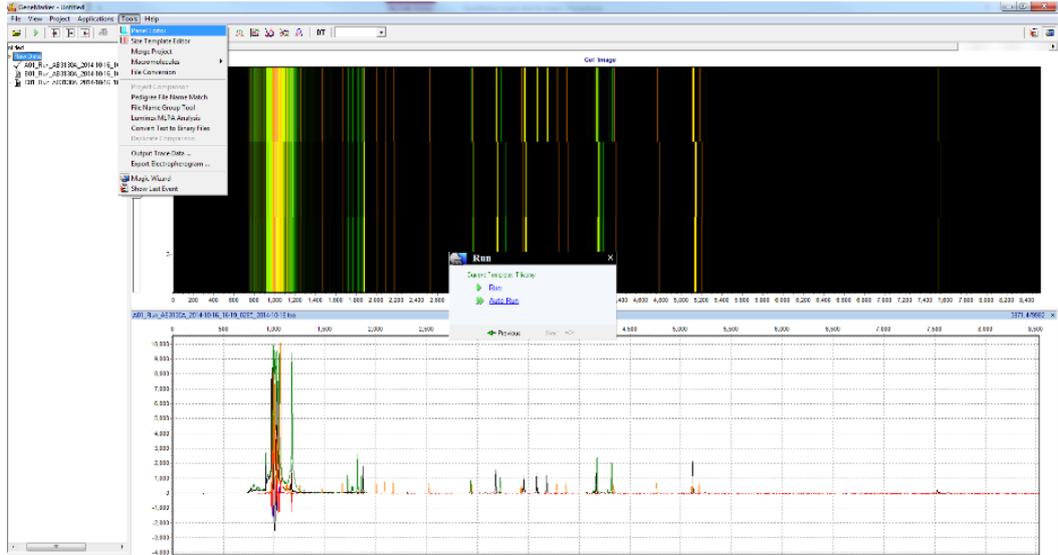
Antes da primeira utilização do kit, é necessário importar o ficheiro do painel CF Iberian para o GeneMarker. Este processo é controlado através da interface do **Panel Editor**.

O ficheiro do painel para o GeneMarker do CF Iberian Panel estão disponíveis na página da Elucigene:

<http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/>

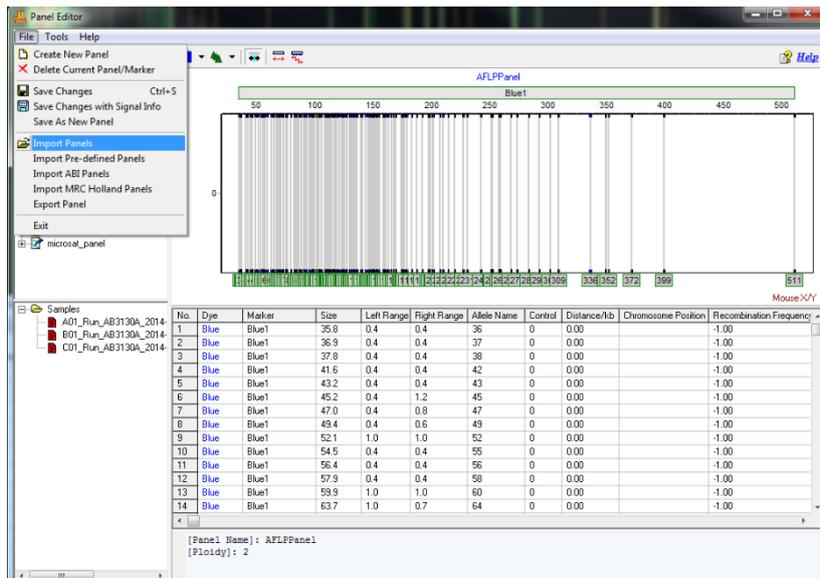
1. Abra **Panel Editor** a partir do menu pendente Tools (Figura 14).

Figura 14: Selecção do editor do painel



2. Seleccione **Import Panels** a partir do menu pendente File (Figura 15)

Figura 15: Importar painéis



3. Navegue para o painel **CF Iberian Panel GeneMarker Panel File.xml** e importe-o.
4. Repita o processo da forma que for necessária para outros ficheiros de painéis relevantes.

Importar as definições de padrão de tamanho para o GeneMarker do CF Iberian Panel

Antes da primeira utilização do kit, é necessário importar o ficheiro de padrão de tamanho adequado para o GeneMarker. Este processo é controlado através da interface do **Size Template Editor**.

O ficheiro do padrão de tamanho para o GeneMarker do CF Iberian Panel está disponível na página da Elucigene:

<http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/>

5. Para o ficheiro do padrão de tamanho, abra **Size Template Editor** a partir do menu pendente Tools.
6. Seleccione **Size Standard** a partir do menu pendente File.
7. Navegue para o ficheiro de padrão de tamanho do CF Iberian Panel **CF Iberian Panel GeneMarker Size Standard.xml** e importe-o.

Dados de processamento

Depois de os ficheiros dos dados não tratados terem sido carregados para o GeneMarker, estarão prontos para ser processados. A etapa de processamento inclui a aplicação de uma norma de dimensionamento, a filtragem de picos ruidosos e a comparação com um painel alélico conhecido, se assim pretendido.

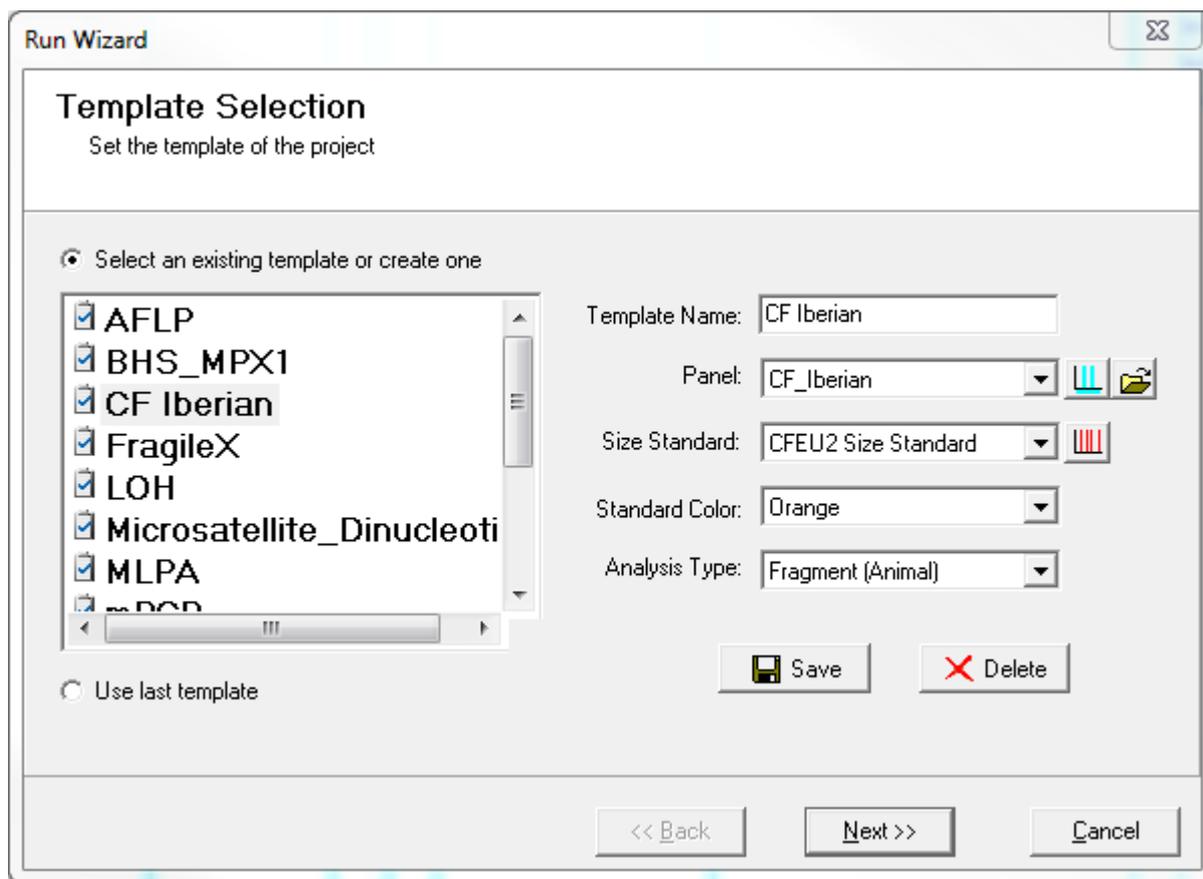
O GeneMarker combina todas estas etapas numa ferramenta simples, chamada **Run Wizard** (Figura 16). Para aceder ao Run Wizard, basta clicar no ícone de Run Project, na barra de ferramentas principal.

Run Wizard – criar um modelo de execução

É necessário criar um modelo de execução da primeira vez que este software é usado para analisar os dados do CF Iberian Panel. Isso é feito através do Run Wizard;

1. Para aceder ao Run Wizard, basta clicar no ícone de **Run Project**, na barra de ferramentas principal.
2. Atribua um nome ao modelo (Template Name), p. ex., CF Iberian
3. Seleccione o painel (Panel), o padrão de tamanho (Size Standard), a cor do padrão (Standard Colour) e o tipo de análise (Analysis Type), como apresentado na Figura 16, em baixo.
4. Clique em **Save** para guardar o modelo para análises futuras.
5. Clique em **Next** para continuar.

Figura 16: Run Wizard – Janela de selecção de modelo



Run Wizard – Processo de dados

A janela Data Process do Run Wizard permite que utilizador seleccione os parâmetros de filtragem do pico.

1. Seleccione as definições de análise adequadas na janela Data Process, da forma apresentada na figura em baixo (Figura 17).
2. Clique em **Next** para continuar.

Nota: A definição da gama de análise dentro do arco de análise de dados não tratados variará, dependendo do polímero usado durante a recolha de dados. O operador deve seleccionar um valor de pontuação de uma data de início, que inclua o pico do padrão de tamanho de 60 bp.

Figura 17: Run Wizard – Janela de processo de dados

The screenshot shows the 'Run Wizard' window with the 'Data Process - Fragment (Animal) Analysis' sub-window. The sub-window has a title bar with a close button (X) and a subtitle 'Set data process options'. The main area is divided into two panels. The left panel, 'Raw Data Analysis', contains several checked options: 'Auto Range (frame)', 'Smooth', 'Peak Saturation', 'Pull-up Correction', and 'Spike Removal'. There are also unchecked options: 'Enhanced Smooth', 'Enhanced Baseline Subtraction'. Spinners for 'Start' (0) and 'End' (60000) are present. The right panel, 'Allele Call', has 'Auto Range (bps)' checked. Spinners for 'Start' (100) and 'End' (1000) are shown. Under 'Peak Detection Threshold', 'Min Intensity' is 100, 'Max Intensity' is 30000, 'Percentage >' is 5, and 'Local Region % >' is 25. At the bottom, there are 'Load Default' and 'Save Default' buttons, and a navigation area with '<< Back', 'Next >>', and 'Cancel' buttons.

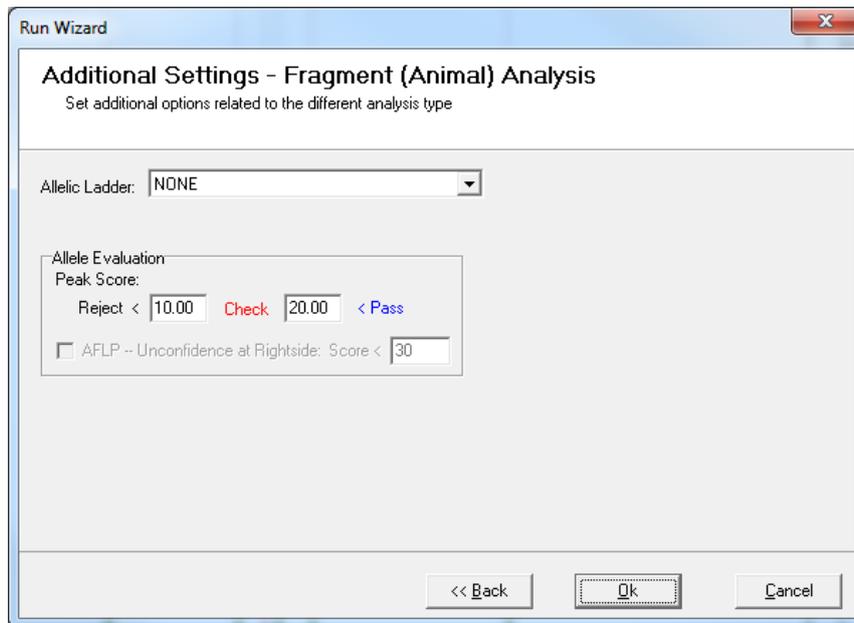
Nota: para dados 3500, aumente a Min. Intensity (intensidade mínima) para 150

Run Wizard – Definições adicionais

Não são necessárias definições adicionais (Figura 18).

1. Clique em **OK** para continuar.

Figura 18: Run Wizard – Additional Settings (Definições adicionais)

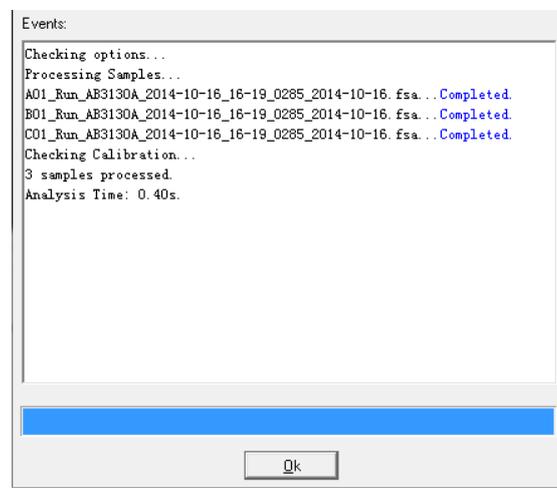


Caixa de processamento de dados

Depois de clicar em **OK** na caixa de definições adicionais do Run Wizard, surge a caixa de processamento de dados (Figura 19). Os dados não tratados são processados e dimensionados e, depois, os parâmetros de filtragem e o painel seleccionado são aplicados.

1. Clique em **OK**, na caixa de processamento de dados, quando a análise for concluída.

Figura 19: Caixa de processamento de dados



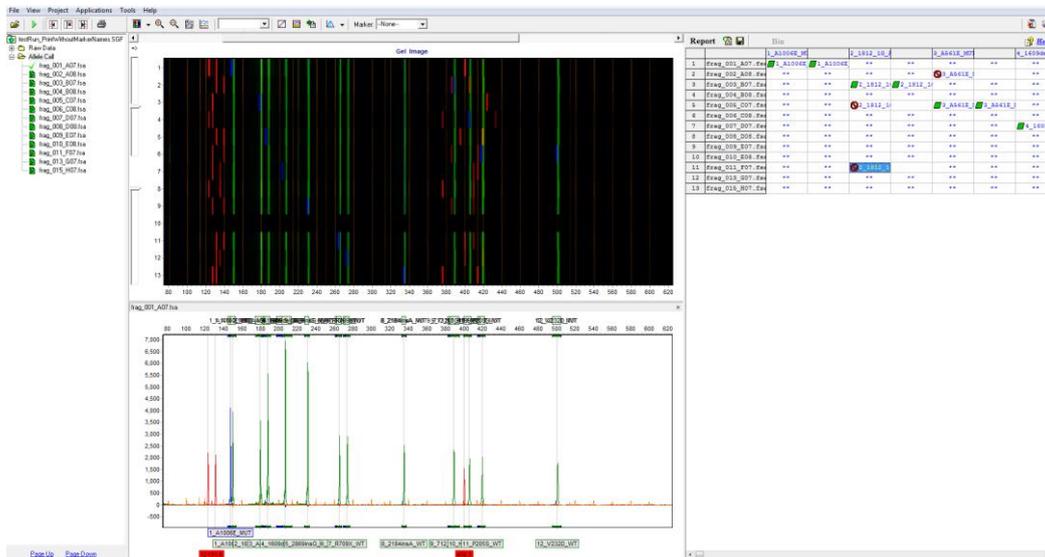
Janela de análise principal

A janela de análise principal (Figura 20) do GeneMarker tem um layout fácil de usar. Este layout incluir:

- A lista de ficheiros de amostra - apresentada do lado esquerdo da janela.
- A imagem de gel sintético - apresentada no topo da janela.
- Electroforograma de dados - por baixo da imagem do gel.
- Uma tabela de relatórios (Report) - apresentada à direita da janela.

Nesta janela, é importante verificar se todos os picos adequados em cada perfil foram considerados correctamente. Faça clique com o botão direito em cada amostra, por sua vez, na árvore de ficheiros de amostras do lado esquerdo do ecrã. Faça clique com o botão direito em qualquer pico em questão e escolha a partir das opções na caixa de diálogo, p. ex., edite ou elimine o alelo, confirme ou retire a confirmação, consoante o adequado.

Figura 20: Janela de análise principal



Pré-visualização do relatório do GeneMarker

Clique em **Preview** para pré-visualizar o relatório do GeneMarker (Figura 21). A partir desta janela, o operador consegue rever e imprimir os dados de pico de cada amostra, fornecendo um relatório de amostra simples, de uma ou duas páginas.

Figura 21: GeneMarker Report (relatório do GeneMarker)



O relatório do GeneMarker inclui as seguintes funcionalidades:

- Cabeçalho do relatório: contém informações sobre a análise, o projecto, a amostra e os parâmetros.
- Electroforograma: Tal como a janela de análise da trissomia, apresenta todas as cores dos corantes do traçado da amostra.

Características do desempenho

Realizou-se o teste ocultado de 35 amostras de DNA (extraídas de sangue total) com o Elucigene CF Iberian Panel. Todas as amostras testadas deram resultados interpretáveis. Desses resultados, 16 eram normais, 1 era heterozigótico para A1006E, 2 eram heterozigóticos para 1812-1G>A, 1 era heterozigótico para A561E, 2 eram heterozigóticos para 1609delCA, 3 eram heterozigóticos para 2869insG, 2 eram heterozigóticos para K710X, 1 era heterozigótico para R709X, 1 era heterozigótico 2184insA, 2 eram heterozigóticos para 712-1G>T, 1 era heterozigótico para H199Y, 1 era um heterozigótico composto para P205S e V232D, e 1 era heterozigótico para V232D. Um heterozigótico 2184delA foi testado e identificado correctamente pelo marcador 2184insA. Todos os resultados mostraram 100% de especificidade e sensibilidade, com resultados anteriormente obtidos por um método alternativo estabelecido.

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.

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
7. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
8. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).

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.

Copyright © 2015 Delta Diagnostics (UK) Ltd.