

# Manual de uso del kit *therascreen*<sup>®</sup> BRAF Pyro<sup>®</sup>



Versión 2



Para uso de diagnóstico in vitro



971470



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
ALEMANIA

R2

MAT

1074213ES



# **QIAGEN: tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular**

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito, desde la muestra hasta el resultado.

## **QIAGEN define los estándares en los siguientes campos:**

- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación con microARN y ARNi
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para obtener más información, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Contenido

<b>Uso previsto</b>	<b>4</b>
<b>Resumen y explicación</b>	<b>4</b>
<b>Principio del procedimiento</b>	<b>5</b>
<b>Materiales suministrados</b>	<b>7</b>
Contenido del kit	7
<b>Materiales requeridos pero no suministrados</b>	<b>9</b>
<b>Advertencias y precauciones</b>	<b>11</b>
Información de seguridad	11
Precauciones generales	11
<b>Almacenamiento y manipulación de reactivos</b>	<b>13</b>
<b>Manipulación y almacenamiento de muestras</b>	<b>13</b>
<b>Procedimiento</b>	<b>14</b>
Aislamiento de ADN	14
■ Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24	15
■ Protocolo 2: Ejecución de la PCR con los reactivos para PCR suministrados con el kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro	18
■ Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance	21
■ Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24	23
■ Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24	28
■ Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24	31
<b>Interpretación de los resultados</b>	<b>34</b>
Interpretación de los resultados del análisis y detección de mutaciones de bajo nivel	34
Guía de resolución de problemas	38
<b>Control de calidad</b>	<b>42</b>
<b>Limitaciones</b>	<b>42</b>
<b>Características de rendimiento</b>	<b>43</b>
<b>Referencias</b>	<b>48</b>
<b>Símbolos</b>	<b>49</b>
<b>Información de contacto</b>	<b>49</b>
<b>Apéndice A: Configuración de los ensayos <i>therascreen</i> BRAF Pyro</b>	<b>50</b>
<b>Apéndice B: Vaciado del contenedor de residuos y los contenedores</b>	<b>53</b>
<b>Información para pedidos</b>	<b>55</b>

## Uso previsto

El kit *therascreen* BRAF Pyro es una prueba de detección *in vitro* de secuencias de ácidos nucleicos que utiliza la tecnología de pirosecuenciación (Pyrosequencing®) para la detección cuantitativa de mutaciones en los codones 600 y 464-469 del gen BRAF humano en ADN genómico obtenido de muestras de tejido humano.

El kit *therascreen* BRAF Pyro se ha diseñado para que los médicos dispongan de información que les ayude a seleccionar los pacientes con cáncer que tienen más probabilidades de beneficiarse de un tratamiento con terapias por inhibición del EGFR. Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Uso exclusivo en el sistema PyroMark® Q24. El sistema PyroMark Q24 incluye:

- El instrumento PyroMark Q24 y el instrumento PyroMark Q24 MDx
- La estación de vacío PyroMark Q24 y la estación de vacío PyroMark Q24 MDx
- El software PyroMark Q24 (versión 2.0) y software PyroMark Q24 MDx (versión 2.0)

Este producto está destinado a profesionales, técnicos y médicos expertos en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*, en técnicas de biología molecular y en el sistema PyroMark Q24.

## Resumen y explicación

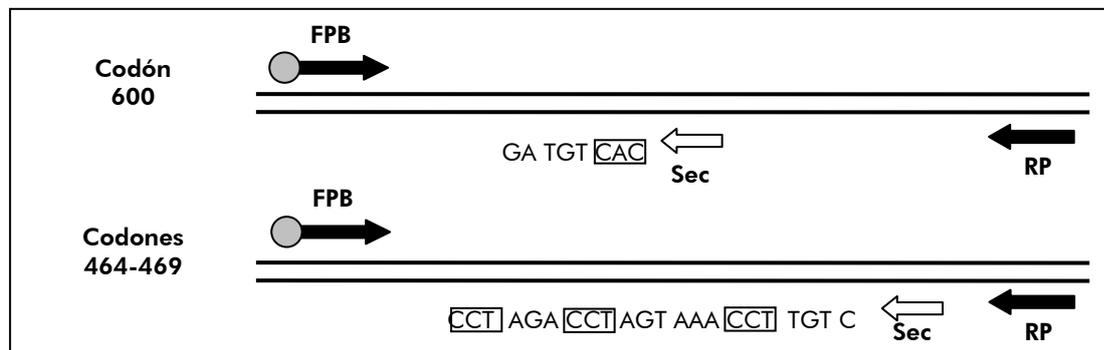
El kit *therascreen* BRAF Pyro se ha desarrollado para la medición cuantitativa de mutaciones en los codones 600 (exón 15) y 464-469 (exón 11) del gen BRAF humano (Ilustración 1).

Exón 15	ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTC TAGCTACA <sup>GTG</sup> AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGT TGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
Exón 11	AAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCTGAT GGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATT <sup>GGA</sup> TCT <sup>GGA</sup> TCATTT <sup>GGA</sup> ACA GTCTACAAGGAAAGTGGCATG

**Ilustración 1. Contexto genómico de las regiones secuenciadas del gen BRAF humano (Ensembl ID ENSG00000157764).** Los codones 600, 464, 466 y 469 están marcados con cuadrados.

Este kit consta de 2 ensayos: uno para la detección de mutaciones en el codón 600 y otro para la detección de mutaciones en los codones 464-469 (Ilustración 2). Las dos regiones se amplifican por separado mediante la técnica de PCR y posteriormente se procede a la secuenciación de la región

definida. Las secuencias colindantes de las posiciones definidas se utilizan como picos de normalización y picos de referencia para la valoración de la cuantificación y calidad del análisis.



**Ilustración 2. Ilustración del ensayo de BRAF.** La secuencia indicada corresponde a la secuencia analizada de una muestra nativa. **FPB**: primers de PCR directos (B indica biotinilación); **RP**: primers de PCR inversos; **Seq**: primers de secuenciación.

Ambos ensayos se secuencian en sentido inverso.

El producto incluye una mezcla de primers de PCR y un primer de secuenciación para cada ensayo. Los primers se suministran en forma de solución. Cada vial contiene 24 µl de cada primer o mezcla de primers.

## Principio del procedimiento

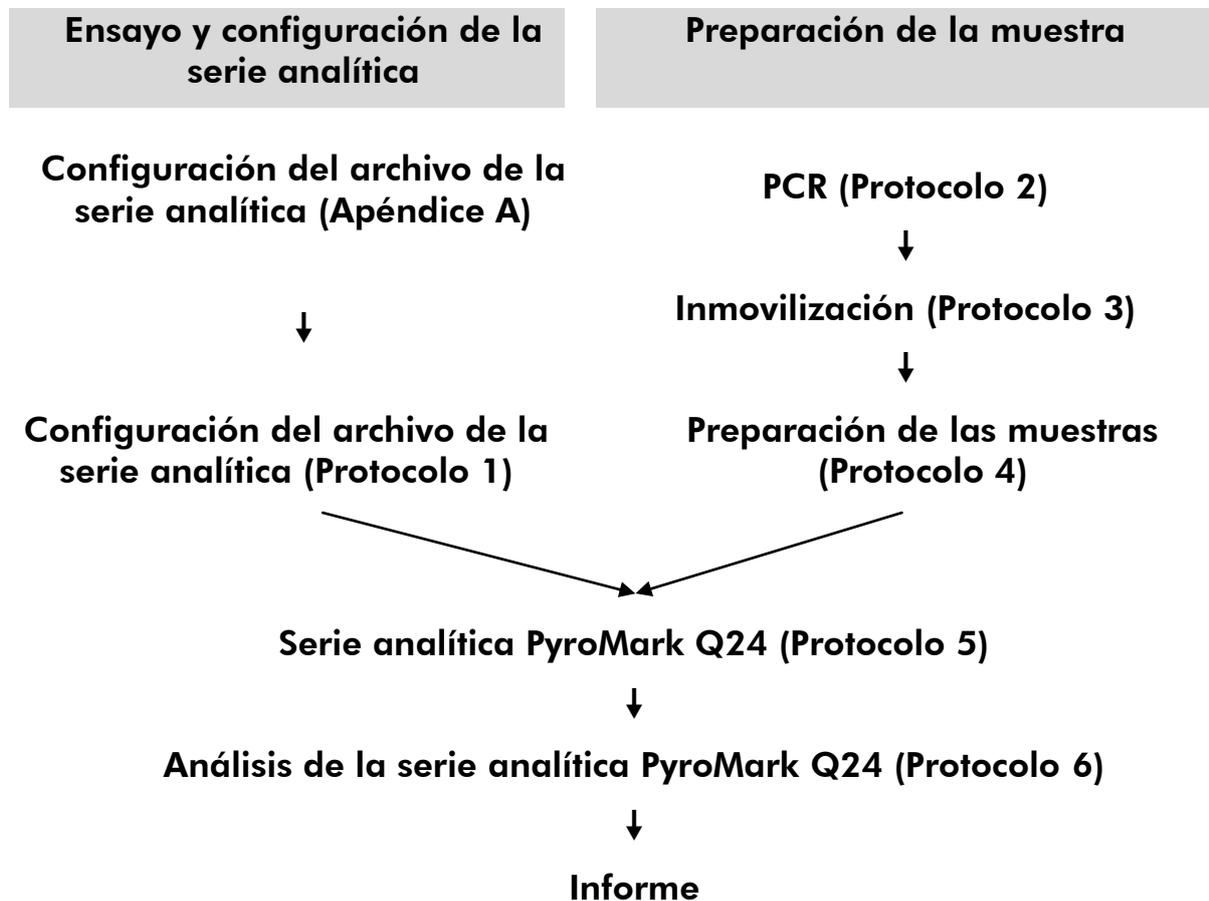
El flujo de trabajo que se muestra en la página 6 ilustra el procedimiento del ensayo. Después de realizar la PCR con primers dirigidos al codón 600 y los codones 464-469, se inmovilizan los amplicones con las microesferas Streptavidin Sepharose® High Performance. A continuación, se prepara el ADN monocatenario y luego se hibridan los primers de secuenciación correspondientes con el ADN. Las muestras se analizan en el sistema PyroMark Q24 utilizando un archivo de configuración de ensayo y un archivo de ensayo.

Se recomienda utilizar BRAF Plug-in Report para analizar la serie analítica. Puede obtener BRAF Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). No obstante, también se puede realizar el análisis con la herramienta de análisis integrada en el sistema PyroMark Q24. El valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) se puede ajustar a fin de detectar mutaciones poco frecuentes una vez finalizada la serie analítica (véase "Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24", página 31).

**Nota:** se ha modificado ligeramente el proceso de trabajo indicado en la revisión anterior del Manual de uso del kit *therascreen BRAF Pyro* (versión 1, julio de 2011). Véanse "Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance", página 21, "Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de

pirosecuenciación en el PyroMark Q24”, página 23 y “Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24”, página 31.

### Proceso de trabajo con el kit *therascreen* BRAF Pyro



### Controles

En el kit se incluye ADN de control no metilado como control positivo para las reacciones de PCR y secuenciación. Este ADN de control presenta un genotipo nativo en las regiones sometidas a secuenciación con este kit y es necesario para realizar una correcta interpretación de los resultados (véase “Interpretación de los resultados”, página 34). Incluya una muestra con ADN de control no metilado para cada ensayo de cada análisis de pirosecuenciación.

Además, debería incluirse un control negativo (sin ADN molde) en cada configuración de PCR de como mínimo un ensayo.

## Materiales suministrados

### Contenido del kit

#### Kit *therascreen* BRAF Pyro (caja 1/2)

<b><i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro) (24)</b>	<b>(24)</b>
<b>N.º de referencia</b>	<b>971470</b>
<b>Número de reacciones</b>	<b>24</b>
Seq Primer BRAF 600 (primer de secuenciación BRAF 600)	24 µl
Seq Primer BRAF 464–469 (primer de secuenciación BRAF 464-469)	24 µl
PCR Primer BRAF 600 (primer de PCR BRAF 600)	24 µl
PCR Primer BRAF 464–469 (primer de PCR BRAF 464-469)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (mezcla maestra PyroMark PCR, 2x)	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x (concentrado CoralLoad®, 10x)	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (ADN de control no metilado, 10 ng/µl)	100 µl

## Tampones y reactivos *therascreen* (caja 2/2)

<b>Tampones y reactivos</b>	
PyroMark Binding Buffer (tampón de unión PyroMark)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (tampón de hibridación PyroMark)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution* (solución de desnaturalización PyroMark)	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (tampón de lavado PyroMark, 10x)	25 ml
Enzyme Mixture (mezcla de enzimas)	1 vial
Substrate Mixture (mezcla de sustratos)	1 vial
dATP $\alpha$ S	1.180 $\mu$ l
dCTP	1.180 $\mu$ l
dGTP	1.180 $\mu$ l
dTTP	1.180 $\mu$ l
<i>therascreen BRAF Pyro Kit Handbook</i> (inglés)	1

\* Contiene hidróxido de sodio.

## Materiales requeridos pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

- Kit para el aislamiento de ADN (véase “Aislamiento de ADN”, página 14)
- Pipetas (ajustables)\*
- Puntas de pipeta estériles (con filtros para la preparación de la PCR)
- Microcentrífuga de mesa\*
- Termociclador\* y tubos para PCR adecuados
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n.º de referencia 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (n.º de referencia 9001513 ó 9001514)\*†
- PyroMark Q24 Software (n.º de referencia 9019063 ó 9019062)†
- PyroMark Q24 Plate (n.º de referencia 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (n.º de referencia 979302)†
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (n.º de referencia 9001515 ó 9001517)\*†
- Agitador de placas\* para la inmovilización de las microesferas
- Bloque térmico\* capaz de alcanzar 80 °C
- Placa de PCR de 24 pocillos o tiras
- Tapas de tiras
- Agua ultrapura (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm o equivalente)  
**Nota:** en el kit se incluye agua suficiente para la PCR, para la inmovilización del ADN y para disolver la mezcla de enzimas y la de sustratos; se necesita agua ultrapura adicional para la dilución del tampón de lavado PyroMark, 10x.
- Etanol (70%)‡

\* Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

† Marcado CE-IVD según la Directiva 98/79/CE de la Unión Europea. El resto de los productos indicados no disponen de marcado CE-IVD según la Directiva 98/79/CE de la Unión Europea.

‡ No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona.

## Mezcladores de placas recomendados

Los mezcladores de placas incluidos en la Tabla 1 están recomendados para el uso combinado con el kit *therascreen* BRAF Pyro.

**Tabla 1. Mezcladores de placas recomendados para el uso combinado con el kit *therascreen* BRAF Pyro**

Fabricante	Producto	N.º de referencia
Eppendorf	Thermomixer comfort (Basic device)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

## Placas de 24 pocillos recomendadas

Las placas de 24 pocillos incluidas en la Tabla 2 están recomendadas para el uso combinado con el kit *therascreen* BRAF Pyro.

**Tabla 2. Placas de 24 pocillos recomendadas para el uso con el kit *therascreen* BRAF Pyro**

Fabricante	Producto	N.º de referencia
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

# Advertencias y precauciones

## Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS). Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN®.

Las siguientes indicaciones de riesgo y advertencia hacen referencia a los componentes del kit *therascreen* BRAF Pyro.

### PyroMark Denaturation Solution



Atención! Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Puede ser corrosivo para los metales. Absorber el vertido para que no dañe otros materiales. Conservar únicamente en el recipiente original. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

### PyroMark Enzyme Mixture



Contiene: (R\*,R\*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Peligro! Provoca irritación cutánea. Provoca lesiones oculares graves. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. SI SE EXPUSO o está afectado: Llame a un CENTRO DEVENENOS o a un médico. Quítese la ropa contaminada y lávela antes de volver a usarla. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

### PyroMark Substrate Mixture



Contiene: acetic acid. Atención! Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. Quítese la ropa contaminada y lávela antes de volver a usarla. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

## Precauciones generales

**Nota:** el usuario debe proceder siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- Siga todas las instrucciones del manual del usuario para obtener resultados óptimos. No se recomienda la dilución de reactivos distintos a los descritos en este manual. De lo contrario, el rendimiento se verá disminuido.
- Se ha modificado ligeramente el proceso de trabajo (véanse “Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance” (página 21), “Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24” (página 23) y “Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24”, página 31) indicado en la revisión anterior del Manual de uso del kit *therascreen BRAF Pyro*.
- Los componentes de este producto son suficientes para realizar 24 reacciones en un máximo de 5 series independientes.
- Utilice puntas de pipeta estériles con filtros (para la configuración de PCR).
- Almacene y extraiga el material positivo (muestras, controles positivos y amplicones) en procedimientos independientes con respecto al resto de reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en una sala separada físicamente.
- Descongele bien todos los componentes a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de iniciar un ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes (mediante pipeteado repetido ascendente y descendente o invirtiendo cada tubo manualmente) y centrifúguelos brevemente.
- Los resultados erróneos no deben tenerse en cuenta para determinar el estado de la mutación.

## Almacenamiento y manipulación de reactivos

El kit *therascreen* BRAF Pyro se envía en dos cajas. El kit *therascreen* BRAF Pyro (caja 1/2) se suministra como envío en hielo seco. La mezcla maestra para PCR PyroMark, el concentrado CoralLoad, el ADN de control no metilado y todos los primers deben conservarse a una temperatura comprendida entre  $-30$  y  $-15$  °C tras su recepción.

Los tampones y reactivos *therascreen* (caja 2/2) que contienen tampones, mezcla de enzimas, mezcla de sustratos, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP y dTTP (los reactivos para el análisis de pirosecuenciación) se suministran en paquetes refrigerados. Estos componentes deben conservarse a una temperatura comprendida entre  $2-8$  °C tras su recepción. Para reducir al mínimo la pérdida de actividad, se recomienda conservar las mezclas de enzimas y sustratos en los viales suministrados.

Las mezclas de enzimas y sustratos reconstituidas se mantienen estables como mínimo 10 días si se conservan a una temperatura comprendida entre  $2-8$  °C. Las mezclas de enzimas y sustratos reconstituidas pueden congelarse y conservarse en sus viales a una temperatura de  $-30$  a  $-15$  °C. Los reactivos congelados no deben someterse a más de 3 ciclos de congelación-descongelación.

**Nota:** no deben congelarse los nucleótidos.

El kit *therascreen* BRAF Pyro se mantiene estable hasta la fecha de caducidad si se conserva en las condiciones especificadas.

## Manipulación y almacenamiento de muestras

Todas las muestras deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

El material de las muestras es ADN humano extraído de muestras sanguíneas o muestras fijadas con formalina e impregnadas en parafina (FFPE).

## Procedimiento

### Aislamiento de ADN

El rendimiento del sistema se ha determinado con el kit EZ1 DNA Tissue y el kit QIAamp® DNA FFPE Tissue para la extracción de ADN humano a partir de muestras tumorales fijadas en formalina e impregnadas en parafina.

Se recomienda utilizar los kits QIAGEN® indicados en la Tabla 3 para la purificación del ADN de los tipos de muestras humanas especificados para uso con el kit *therascreen* BRAF Pyro. Lleve a cabo la purificación del ADN según las instrucciones de los manuales de cada kit.

**Tabla 3. Kits de purificación del ADN recomendados para el uso con el kit *therascreen* BRAF Pyro**

<b>Material de las muestras</b>	<b>Kit de aislamiento de ácidos nucleicos</b>	<b>Número de referencia (QIAGEN)</b>
Tejido impregnado en parafina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034

\* Siga el protocolo para uso con tejido impregnado en parafina. El kit EZ1 DNA Tissue debe utilizarse en combinación con las tarjetas EZ1 Advanced (n.º de referencia 9001410 ó 9001411) y EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (n.º de referencia 9018298), con las tarjetas EZ1 Advanced XL (n.º de referencia 9001492) y EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (n.º de referencia 9018700) o con la tarjeta BioRobot® EZ1 (n.º de referencia 9000705; no disponible) y EZ1 DNA Paraffin Section Card (n.º de referencia 9015862).

# Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24

## Cuestiones importantes antes de comenzar

- Si es necesario, es posible confirmar el valor del LOB con una muestra nativa a fin de generar una placa completa de resultados. Para obtener información más detallada, consulte la directriz EP17-A del CLSI “Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (Protocolo para la determinación de los límites de detección y cuantificación; directriz aprobada).

## Antes de comenzar

- Si todavía no se ha instalado BRAF Plug-in Report, cree una configuración de ensayo (véase “Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* BRAF Pyro”, página 50). Este paso debe realizarse solamente una vez antes de ejecutar el ensayo *therascreen* BRAF Pyro por primera vez. Si se ha instalado BRAF Plug-in Report, encontrará las configuraciones de ensayo predefinidas en el navegador de accesos directos del software PyroMark Q24, en la ruta “Example Files/PyroMark Setups/BRAF”. Puede obtener BRAF Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

## Procedimiento

- 1. Haga clic en  en la barra de herramientas.**  
Se creará un nuevo archivo de serie analítica.
- 2. Introduzca los parámetros de la serie (véase “Parámetros de la serie analítica”, página 16).**
- 3. Configure la placa. Para ello, añada los ensayos para el codón 600 y los codones 464-469 a los pocillos correspondientes a las muestras para analizar.**  
**Nota:** debería incluirse una muestra negativa (sin ADN molde) en cada configuración de PCR de como mínimo un ensayo.  
**Nota:** incluya una muestra con ADN de control no metilado para cada ensayo de cada análisis de pirosecuenciación (véase “Controles”, página 6).
- 4. Una vez configurado el ensayo y cuando ya está listo para ser analizado en el sistema PyroMark Q24, imprima una lista de los volúmenes necesarios para la mezcla de enzimas y de sustratos, de los nucleótidos y la configuración de la placa. Seleccione “Pre Run**

**Information” (Información previa de la serie) en el menú “Tools” (Herramientas) y, cuando aparezca el informe, haga clic en .**

**5. Cierre el archivo de la serie analítica y cópielo en una unidad USB (suministrada con el sistema) mediante el Explorador de Windows®.**

**Nota:** la información previa de la serie impresa puede servir como molde para la configuración de la muestra (véase “Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance”, página 21).

Para realizar la serie analítica de la placa en un sistema PyroMark Q24, consulte el apartado “Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24”, página 28.

### **Parámetros de la serie analítica**

“Run name” (Nombre de la serie analítica):	El nombre de la serie analítica se asigna al guardar el archivo. Si se modifica el nombre del archivo se modifica también el de la serie analítica.
“Instrument method” (Método del equipo):	Seleccione el método del equipo en función del cartucho que se vaya a utilizar para la serie analítica. Consulte las instrucciones suministradas con los productos.
“Plate ID” (Identificador de la placa):	<b>Opcional:</b> introduzca el identificador de la placa PyroMark Q24.
“Bar code” (Código de barras):	<b>Opcional:</b> introduzca un número de código de barras para la placa o, si tiene un lector de códigos de barras conectado al ordenador, sitúe el cursor del ratón en el cuadro de texto “Barcode” (Código de barras) haciendo clic en el cuadro y escanee el código de barras.
“Kit and Reagent ID” (Identificador del kit y de los reactivos):	<b>Opcional:</b> introduzca el número de lote del kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro que se va a utilizar. El número de lote se halla en la etiqueta del producto. <b>Nota:</b> se recomienda introducir tanto el identificador del reactivo como el del kit a fin de poder realizar un seguimiento de posibles problemas que puedan surgir con los reactivos.
“Run note” (Nota de la serie analítica):	<b>Opcional:</b> escriba una nota sobre el contenido o la finalidad de la serie analítica.

## **Añadir archivos de ensayo**

Existen distintos modos de añadir un ensayo a un pocillo:

- Hacer clic con el botón derecho en el pocillo y seleccionar la opción “Load Assay” (Cargar ensayo) del menú contextual
- Seleccionar el ensayo en el navegador de accesos directos y hacer clic y arrastrar el ensayo hasta el pocillo

El color de cada pocillo varía en función del ensayo que se haya cargado.

## **Introducir identificadores de muestras y notas**

Para introducir un identificador de muestra o una nota, seleccione la celda correspondiente y escriba el texto.

Para editar un identificador de muestra o una nota, seleccione la celda (con lo cual se selecciona el contenido actual) o haga doble clic en la misma.

## Protocolo 2: Ejecución de la PCR con los reactivos para PCR suministrados con el kit *therascreen* BRAF Pyro

Este protocolo se ha diseñado para amplificaciones mediante PCR de una región que contenga el codón 600 y para la amplificación independiente mediante PCR de una región que contenga los codones 464-469 utilizando el kit *therascreen* BRAF Pyro.

### Cuestiones importantes antes de comenzar

- La enzima HotStarTaq® ADN polimerasa de la mezcla maestra para PCR PyroMark requiere un paso de activación de **15 minutos a 95 °C**.
- Lleve a cabo todas las mezclas de reacción en una zona distinta de la utilizada para la purificación del ADN. Añada ADN molde a la PCR, al análisis de los productos de PCR o a la preparación de las muestras antes de proceder al análisis de pirosecuenciación.
- Utilice puntas desechables con filtros hidrofóbicos para reducir al mínimo la contaminación cruzada.

### Antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos con primers para PCR, centrifúguelos brevemente para depositar el contenido en el fondo de los tubos.
- Ajuste la concentración del ADN de control y de muestra a 0,4-2 ng/ $\mu$ l si es necesario.

### Procedimiento

- 1. Descongele todos los componentes necesarios (consulte la Tabla 4).**  
Mézclelos bien antes de utilizarlos.
- 2. Prepare una mezcla de reacción para cada conjunto de primers para PCR según los datos de la Tabla 4.**

Por norma general, la mezcla de reacción contiene todos los componentes necesarios para la PCR excepto la muestra.

Prepare un volumen de mezcla de reacción superior al necesario para el número total de ensayos de PCR que se vayan a realizar.

**Tabla 4. Preparación de la mezcla de reacción para cada mezcla de primers para PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volumen/reacción (µl)</b>
Mezcla maestra PyroMark PCR, 2x	12,5
Concentrado CoralLoad, 10x	2,5
Primer para PCR BRAF codón 600 ○ primer para PCR BRAF codones 464-469	1,0
Agua (H <sub>2</sub> O, suministrada)	4,0
<b>Volumen total</b>	<b>20,0</b>

**3. Agite bien la mezcla de reacción y luego dispense 20 µl en cada tubo de PCR.**

No es necesario mantener los tubos de PCR en hielo, puesto que la enzima HotStarTaq ADN polimerasa se mantiene inactiva a temperatura ambiente.

**4. Añada 5 µl de ADN molde (2-10 ng de ADN genómico) a cada uno de los tubos de PCR (consulte la Tabla 5) y mezcle bien el contenido.**

**Nota:** debería incluirse una muestra de control negativo (sin ADN molde) en cada configuración de PCR de como mínimo un ensayo.

**Nota:** incluya una muestra con ADN de control no metilado para cada ensayo de cada análisis de pirosecuenciación (véase "Controles" página 6).

**Tabla 5. Preparación de la PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volumen/reacción (µl)</b>
Mezcla de reacción	20
ADN de muestra	5
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>

5. Programe el termociclador según las instrucciones del fabricante y las condiciones descritas en la Tabla 6.

**Tabla 6. Protocolo de ciclado optimizado**

			<b>Comentarios</b>
<b>Paso de activación inicial:</b>	15 minutos	95 °C	La enzima HotStarTaq ADN polimerasa se activa con este paso de calentamiento.
<b>Ciclado en 3 pasos:</b>			
Desnaturalización	20 segundos	95 °C	
Hibridación	30 segundos	53 °C	
Extensión	20 segundos	72 °C	
Número de ciclos	42		
<b>Extensión final:</b>	5 minutos	72 °C	

6. Introduzca los tubos de PCR en el termociclador e inicie el programa de ciclado.
7. Una vez terminada la amplificación, prosiga con el "Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance", página 21.

## Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance

Este protocolo tiene como finalidad la inmovilización del ADN molde en microesferas Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) antes de proceder al análisis en el sistema PyroMark Q24.

### Antes de comenzar

- Los reactivos y las soluciones deben estar a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de empezar.

### Cuestiones importantes antes de comenzar

- Se ha modificado ligeramente el proceso de trabajo indicado en la revisión anterior del Manual de uso del kit *therascreen* BRAF Pyro (versión 1, julio de 2011, paso 2).

### Procedimiento

1. **Agite con suavidad la botella de Streptavidin Sepharose High Performance hasta que se forme una solución homogénea.**
2. **Prepare una mezcla maestra para la inmovilización del ADN según los datos de la Tabla 7. Prepare un 10% de volumen más del necesario para el número total de reacciones que se vayan a realizar.**

**Tabla 7. Mezcla maestra para inmovilización de ADN**

Componente	Volumen/muestra (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Tampón de unión PyroMark	40
Agua (H <sub>2</sub> O, suministrada)	29
<b>Volumen total</b>	<b>70</b>

**Nota:** este protocolo se aplica a Streptavidin Sepharose High Performance con número de lote 10057037 o superior. Si se utilizan microesferas Streptavidin Sepharose High Performance con un número de lote inferior a 10057037, el volumen de microesferas por muestra utilizado debe incrementarse a 2 µl, mientras que el volumen de agua debe reducirse de forma apropiada.

3. **Añada 70  $\mu$ l de mezcla maestra a los pocillos de la placa de PCR de 24 pocillos o a las tiras, según se haya definido en la configuración de la serie analítica (véase “Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24”, página 15).**

4. **Añada 10  $\mu$ l de producto de PCR biotinilado del Protocolo 2 a cada pocillo que contenga mezcla maestra, según se haya definido en la configuración del ensayo (véase “Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24”, página 15).**

**Nota:** el volumen total por pocillo debería ser de 80  $\mu$ l tras la adición de la mezcla maestra y el producto de PCR.

5. **Cierre herméticamente la placa de PCR (o tiras) con las tapas de tiras.**

**Nota:** asegúrese de que no pueda haber fugas entre pocillos.

6. **Agite la placa de PCR hasta que alcance la temperatura ambiente (15-25 °C) durante 5-10 minutos a 1.400 rpm.**

**Nota:** durante la ejecución de este paso, prepare la estación de vacío PyroMark Q24 para llevar a cabo la preparación de las muestras tal como se describe en el manual de usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

7. **Proceda inmediatamente con el “Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24”, página 23.**

**Nota:** las microesferas Sepharose tienen un proceso de sedimentación rápido. La captura de las microesferas debe realizarse inmediatamente después de la agitación.

Si transcurre más de 1 minuto desde la agitación de la placa (o las tiras), vuelva a agitarla durante 1 minuto antes de capturar las microesferas.

## Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24

Este protocolo tiene como objetivo la preparación de ADN monocatenario y la hibridación del primer de secuenciación con el molde antes de que se realice el análisis de pirosecuenciación en el equipo PyroMark Q24.

### Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos con primers de secuenciación, centrifúgelos brevemente para depositar el contenido en el fondo de los tubos.
- Añada los 2 primers de secuenciación distintos al mismo patrón tal como se ha definido previamente para la placa durante la configuración del ensayo (véase "Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", página 15), según la región que se vaya a analizar (codón 600 o codones 464-469).
- Se ha modificado ligeramente el proceso de trabajo indicado en la revisión anterior del Manual de uso del kit *BRAF Pyro* (versión 1, julio de 2011, paso 18). No acorte el tiempo de enfriamiento de las muestras después de calentarlas a 80 °C.
- Realice regularmente la prueba de funcionamiento de las sondas de filtros tal como se describe en el manual de usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) y sustitúyalas según se indique.

### Antes de comenzar

- Introduzca un soporte para placas PyroMark Q24 en un bloque térmico precalentado a 80 °C para su uso en el paso 17. Mantenga un segundo soporte para placas PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15-25 °C) para utilizarlo en el paso 18.
- El tampón de lavado PyroMark se suministra como concentrado 10x. Antes de utilizar el concentrado por primera vez, dilúyalo con solución de trabajo al 1x añadiendo 225 ml de agua ultrapura en 25 ml de tampón de lavado PyroMark 10x (volumen final de 250 ml).

**Nota:** la solución de trabajo de tampón de lavado PyroMark 1x se mantiene estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada.

## Procedimiento

1. **Diluya una cantidad suficiente de cada primer de secuenciación, primer de secuenciación BRAF 600 o primer de secuenciación BRAF 464-469 en el tampón de hibridación PyroMark tal como se muestra en la Tabla 8.**

Prepare un volumen de primer de secuenciación diluido superior al necesario para el número total de muestras que se vayan a secuenciar (para el número de muestras + una adicional).

No diluya ni almacene más primer de secuenciación.

**Tabla 8. Ejemplo de dilución para primers de secuenciación**

<b>Componente</b>	<b>Volumen/muestra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Volumen para 9 + 1 reacciones (<math>\mu</math>l)</b>
Primer de secuenciación BRAF 600 ●	0,8	8
Primer de secuenciación BRAF 464-469		
Tampón de hibridación PyroMark	24,2	242
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

2. **Añada 25  $\mu$ l del primer de secuenciación diluido a cada pocillo de la placa PyroMark Q24 de acuerdo con la configuración de la serie analítica (véase "Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", página 15).**

**Nota:** mantenga uno de los soportes para placas PyroMark Q24 (suministrados con la estación de vacío PyroMark Q24) a temperatura ambiente (15-25 °C) y utilícelo como soporte para la preparación de la placa y su desplazamiento.

3. **Coloque la placa de PCR (o las tiras) del Protocolo 3 y la placa PyroMark Q24 en la tabla de trabajo (Ilustración 3).**

Inspeccione la placa de PCR y asegúrese de que las microesferas Sepharose están en la solución.

**Nota:** asegúrese de cargar la placa con la misma orientación en la que se han cargado las muestras.



**Ilustración 3.** Colocación de la placa de PCR (o tiras) y de la placa PyroMark Q24 en la estación de vacío.

4. Conecte el interruptor de vacío para aplicar vacío a la herramienta.
5. Introduzca con cuidado las sondas de filtro de la herramienta de vacío en la placa de PCR (o tiras) para capturar las microesferas que contienen el molde inmovilizado. Mantenga las sondas en su sitio durante 15 segundos. Extreme la precaución a la hora de tomar la herramienta de vacío.

**Nota:** las microesferas Sepharose tienen un proceso de sedimentación rápido. Si transcurre más de 1 minuto desde la agitación de la placa (o las tiras), vuelva a agitarla durante 1 minuto antes de capturar las microesferas.

Inspeccione la placa de PCR para comprobar si la herramienta de vacío ha succionado todas las muestras completamente.

6. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 40 ml de etanol al 70% (Ilustración 3). Aclare las sondas de filtros durante 5 segundos.
7. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 40 ml de solución de desnaturalización (Ilustración 3). Aclare las sondas de filtros durante 5 segundos.
8. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 50 ml de tampón de lavado (Ilustración 3). Aclare las sondas de filtros durante 10 segundos.
9. Suba la herramienta de vacío e inclínela más de 90° hacia atrás, durante 5 segundos, para drenar el líquido de las sondas de filtros (Ilustración 4).



**Ilustración 4.** Ilustración de la herramienta de vacío levantada en vertical más de 90°.

- 10. Mientras sostiene la herramienta encima de la placa PyroMark Q24, desconecte el interruptor de vacío de la herramienta (Off).**
- 11. Libere las microesferas de la placa PyroMark Q24. Para hacerlo, introduzca las sondas de filtro en el primer de secuenciación diluido y mueva la herramienta suavemente de lado a lado.**

**Nota:** extreme la precaución para no dañar la superficie de la placa PyroMark Q24 arañándola con las sondas de filtro.
- 12. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor de agua ultrapura (Ilustración 3) y agítela durante 10 segundos.**
- 13. Introduzca las sondas en el agua ultrapura (Ilustración 3) y aplique el vacío para lavar las sondas de filtros. Aclare las sondas con 70 ml de agua ultrapura.**
- 14. Suba la herramienta de vacío e inclínela más de 90° hacia atrás, durante 5 segundos, para drenar el líquido de las sondas de filtros (Ilustración 4).**
- 15. Desconecte el interruptor de vacío de la herramienta (Off) y colóquela en la posición de reposo [Parking (P)].**
- 16. Desconecte la bomba de vacío.**

**Nota:** al finalizar el día de trabajo, deben desecharse los residuos líquidos y las soluciones restantes y debe revisarse la estación de vacío PyroMark Q24 para comprobar que no haya polvo ni líquido derramado (véase el Apéndice B, página 53).
- 17. Caliente la placa PyroMark Q24 con las muestras a 80 °C durante 2 minutos mediante el soporte para placas precalentado PyroMark Q24.**

- 18. Retire la placa PyroMark Q24 del soporte para placas calientes y colóquela en el segundo soporte para placas PyroMark Q24 que había dejado a temperatura ambiente (15-25 °C) para permitir que las muestras se enfríen a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.**
- 19. Proceda con el "Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24", página 28.**

## Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24

Este protocolo describe el proceso de preparación y carga de los reactivos PyroMark Gold Q24 en el cartucho PyroMark Q24, así como los procesos de inicio y finalización de una serie en el sistema PyroMark Q24. Si desea obtener una descripción detallada sobre la configuración de una serie analítica, consulte el manual de usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

### Cuestiones importantes antes de comenzar

- El informe "Pre Run information" (Información previa de la serie), que encontrará en el menú "Tools" (Herramientas) durante la configuración de la serie (consulte el apartado "Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", página 15), incluye información sobre el volumen de los nucleótidos, las enzimas y los tampones de sustratos necesarios para cada serie.

### Antes de comenzar

- Encienda el sistema PyroMark Q24. El botón de encendido se halla en la parte posterior del equipo.

### Procedimiento

1. **Disuelva las mezclas de enzimas y sustratos congeladas y secadas en 620 µl de agua cada una (H<sub>2</sub>O, suministrada).**
2. **Agite suavemente el vial para mezclar bien el contenido.**

**Nota:** ¡no lo agite mediante vórtice!

**Nota:** para garantizar que la mezcla se disuelva por completo, déjela reposar a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 5-10 minutos. Antes de llenar el cartucho PyroMark Q24, asegúrese de que la solución no esté turbia. Si no va a utilizar los reactivos inmediatamente, conserve los viales de reactivos en hielo<sup>§</sup> o en una nevera.

3. **Espere a que los reactivos y el cartucho PyroMark Q24 alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C).**
4. **Coloque el cartucho PyroMark Q24 con la etiqueta mirando hacia usted.**

<sup>§</sup> Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre la seguridad de los materiales (MSDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

5. **Cargue el cartucho PyroMark Q24 con los volúmenes adecuados de nucleótidos, enzimas y mezclas de sustratos de acuerdo con los datos de la Ilustración 5.**

Asegúrese de que no se transfieran burbujas de aire de la pipeta al cartucho.



**Ilustración 5. Ilustración de la vista superior del cartucho PyroMark Q24.** Las anotaciones corresponden a la etiqueta de los viales de reactivos. Añada el volumen de mezcla de enzimas (**E**), mezcla de sustratos (**S**) y nucleótidos (**A**, **T**, **C**, **G**) que se indica en la información sobre volúmenes del informe de información previa de la serie, que encontrará en el menú "Tools" (Herramientas) durante la configuración del ensayo.

6. **Abra el compartimento para cartuchos e introduzca el cartucho cargado con reactivos con la etiqueta mirando hacia afuera. Empuje el cartucho hasta el final y luego presione hasta que encaje.**
7. **Asegúrese de que la línea en la parte frontal del cartucho sea visible y cierre el compartimento.**
8. **Abra el bastidor para placas y coloque la placa en el bloque térmico.**
9. **Cierre el bastidor para placas y la cubierta del equipo.**
10. **Conecte la unidad USB (donde se ha guardado el archivo de la serie analítica) al puerto USB situado en la parte frontal del equipo.**  
**Nota:** no desconecte la unidad USB hasta que finalice la serie analítica.
11. **Seleccione "Run" (Ejecutar serie analítica) en el menú principal (mediante los botones ▲ y ▼ de la pantalla) y luego pulse "OK" (Aceptar).**
12. **Seleccione el archivo de la serie analítica mediante los botones ▲ y ▼ de la pantalla.**  
**Nota:** si desea ver el contenido de una carpeta, selecciónela y luego pulse "Select" (Seleccionar). Para volver a la vista anterior, pulse "Back" (Atrás).
13. **Una vez seleccionado el archivo de la serie analítica, pulse "Select" (Seleccionar) para iniciar la serie analítica.**
14. **Cuando termina la serie analítica y el equipo confirma que el archivo de la serie analítica se ha guardado en la unidad USB, pulse "Close" (Cerrar).**
15. **Retire la unidad USB.**
16. **Abra la tapa del equipo.**

- 17. Abra el compartimento para cartuchos y extraiga el cartucho de reactivos (levántelo y sáquelo).**
- 18. Cierre el compartimento.**
- 19. Abra el bastidor para placas y extraiga la placa del bloque térmico.**
- 20. Cierre el bastidor para placas y la cubierta del equipo.**
- 21. Deseche la placa y limpie el cartucho siguiendo las instrucciones de la hoja del producto suministradas con el cartucho.**
- 22. Revise la serie analítica según las indicaciones del apartado "Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24", en la página 31.**

## Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24

En este protocolo se describe el análisis de mutaciones de un análisis BRAF finalizado realizado con el software PyroMark Q24.

### Procedimiento

1. **Introduzca la unidad USB donde haya guardado el archivo de la serie analítica procesado en el puerto USB del ordenador.**
2. **Copie el archivo de la serie analítica de la unidad USB a la ubicación deseada del ordenador mediante el Explorador de Windows.**
3. **Abra el archivo de la serie analítica en el modo AQ del software PyroMark Q24. Para hacerlo, seleccione "Open" (abrir) en el menú "File" (archivo) o haga doble clic en el archivo (👉) desde el navegador de accesos directos.**
4. **Dispone de 2 métodos para analizar la serie analítica. Si utiliza BRAF Plug-in Report, vaya al paso 5. Si utiliza el análisis AQ incluido en el sistema PyroMark Q24, vaya al paso 6.**

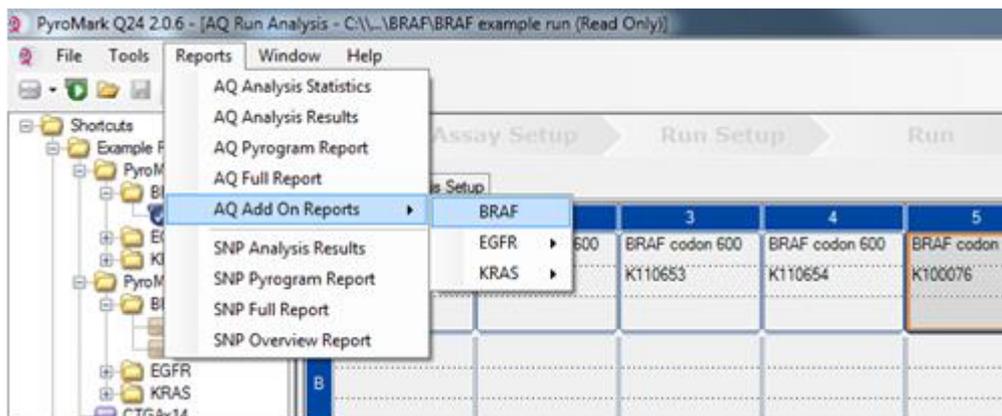
**Nota:** se recomienda utilizar BRAF Plug-in Report para la interpretación de los resultados. Puede obtener BRAF Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). Este informe es una garantía de que se van a utilizar los valores de LOD (Tabla 9) y los diferentes valores de "Sequences to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) correspondientes para detectar automáticamente todas las mutaciones.

**Nota:** las mutaciones complejas en los codones 600 y 469 de BRAF no se pueden analizar mediante el análisis AQ del software PyroMark Q24. Se recomienda utilizar BRAF Plug-in Report para el análisis de las mutaciones complejas de los codones 600 y 469.

**Nota:** es posible que algunas de las mutaciones indicadas del codón 600, así como las mutaciones G469A y G469S, no se distinguen con precisión a niveles de mutación inferiores al 10%.

5. **Si utiliza BRAF Plug-in Report:**

**Para generar un informe, seleccione "AQ Add On Reports/BRAF" (Añadir AQ en informes/BRAF) en el menú "Reports" (Informes) (véase la Ilustración 6).**



**Ilustración 6. Menú de BRAF Plug-in Report**

Se analizan automáticamente todos los pocillos para detectar todas las mutaciones cuyos valores LOD se indican en la Tabla 9. Los resultados se presentan en una tabla de resumen (Ilustración 7), además de resultados detallados que incluyen, por ejemplo, pirogramas y análisis de calidad.

### Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4,8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34,6	1798 1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26,4	1798 1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29,0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27,8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

**Ilustración 7. BRAF Plug-in Report.**

## 6. Si utiliza el análisis AQ:

**Para analizar la serie analítica y obtener un resumen de los resultados, haga clic en uno de los botones de análisis.**



Analizar todos los pocillos



Analizar el pocillo seleccionado

Los resultados del análisis (frecuencias de alelos) y la valoración de la calidad se muestran encima de la posición de variable en el trazado del Pyrogram<sup>®</sup>. Si desea obtener una descripción detallada sobre cómo realizar una serie analítica, consulte el manual de usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

**7. Para generar un informe, seleccione “AQ Full Report” (Informe completo de AQ) o “AQ Analysis Results” (Resultados del ensayo AQ) en el menú “Reports” (Informes).**

**Nota:** para garantizar la fiabilidad de los resultados, se recomienda utilizar alturas de pico individual superiores a 30 RLU. Defina el valor “required peak height for passed quality” (altura de pico necesaria para calidad garantizada) en 30 RLU durante la configuración del ensayo (consulte el Apéndice A y el manual de usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*)).

**Nota:** se recomienda utilizar el informe de resultados del análisis AQ, “AQ Analysis Results”, para documentar e interpretar la cuantificación de los alelos. Los números que se muestran en el pirograma son números redondeados que no indican la cuantificación exacta.

**Nota:** el pirograma debe compararse siempre con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana de pirograma. Los picos medidos deberían coincidir con la altura de las barras del histograma.

**Repetición del análisis de muestras en las que no se ha detectado una mutación GTG → GAG o cuyas valoraciones de calidad han obtenido los valores “Check” (Revisar) o “Failed” (Errónea)**

La mutación más frecuente del gen BRAF es la mutación GTG → GAG en el nucleótido 1799 (segunda base del codón 600). Por lo tanto, el valor estándar de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar) definido durante la configuración del ensayo es el que se utiliza para detectar esta mutación (véase el “Apéndice A: Configuración de los ensayos theascreen BRAF Pyro”, página 50).

Se recomienda volver a analizar todas las muestras en las que no se ha detectado mutación con el valor estándar de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar), así como todas las muestras para las que se han obtenido los valores “Check” (Revisar) o “Failed” (Errónea) en la valoración de la calidad o que muestran picos que no coinciden con la altura de las barras del histograma. Las valoraciones de calidad con un valor “Check” (Revisar) y “Failed” (Errónea) pueden ser indicio de una mutación que no se analice con el valor estándar de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar) y que puede dar lugar a desviaciones en la altura de los picos.

Para volver a analizar y detectar las mutaciones en los nucleótidos 1798 ó 1799, vaya a “Analysis Setup” (Configuración del análisis) y modifique el valor de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar) a uno de los valores que se muestran en “Apéndice A: Configuración de los ensayos theascreen BRAF Pyro”, página 50. Haga clic en “Apply” (Aplicar) y luego

en "To All" (A todos) cuando aparezca la ventana "Apply Analysis Setup" (Aplicar configuración del análisis).

Las frecuencias actualizadas de las mutaciones en el codón 600 y los codones 464-469 del gen BRAF humano se pueden descargar en línea desde el sitio Web del Instituto Sanger:

[www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

**Nota:** después de cambiar el valor de la opción "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar), asegúrese de que el umbral para la altura de pico único se haya definido en 30 RLU.

**Nota:** es posible que existan mutaciones poco frecuentes o no previstas adicionales en la región secuenciada. Dichas mutaciones se pueden analizar mediante los valores alternativos para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) teniendo en cuenta las mutaciones no previstas.

**Nota:** si los picos medidos no coinciden con la altura de las barras del histograma y dicha diferencia no se debe a mutaciones poco frecuentes o no previstas, se recomienda volver a analizar la muestra.

## Interpretación de los resultados

### Interpretación de los resultados del análisis y detección de mutaciones de bajo nivel

Se recomienda incluir ADN de control no metilado en cada serie analítica para realizar la comparación y como control para los niveles de referencia. La frecuencia medida de la muestra de control debería ser inferior o igual que el límite de blanco (LOB).

Deben examinarse todas las muestras para evaluar el límite de detección (LOD, Tabla 9) y los resultados deben interpretarse como se indica a continuación.

- Frecuencia de la mutación  $< LOD$ : mutación no detectada
- Frecuencia de la mutación  $\geq LOD$  y  $\leq LOD + 3$  unidades porcentuales: posible mutación de bajo nivel

**Nota:** si utiliza BRAF Plug-in Report (paso 5 del apartado "Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24", en la página 28) y se da este caso, aparecerá un aviso.

Las muestras cuyos resultados indican la posible presencia de una mutación de bajo nivel solamente se pueden considerar positivas para la mutación si dicha posibilidad se confirma al analizarlas por duplicado con una muestra que contenga ADN de control no metilado. El resultado de ambos duplicados debería ser  $\geq LOD$  y distinto de la muestra de control. De lo

contrario, la muestra se considera “No mutation detected” (Mutación no detectada).

- Frecuencia de la mutación  $> \text{LOD} + 3$  unidades porcentuales: mutación  
Si utiliza BRAF Plug-in Report, la comparación se lleva a cabo de forma automática.

**Nota:** se recomienda utilizar BRAF Plug-in Report para la interpretación de los resultados. Para realizar un examen más detenido de las muestras con posibles mutaciones de bajo nivel se recomienda analizar también la muestra manualmente en el software de la aplicación (p. ej., para comparar la frecuencia mutacional de la muestra de control).

**Nota:** es posible que algunas de las mutaciones indicadas del codón 600, así como las mutaciones G469A y G469S, no se distingan con precisión a niveles de mutación inferiores al 10%.

**Nota:** una frecuencia medida superior al LOB en la muestra de control indica un nivel de fondo superior al habitual en la serie analítica correspondiente, lo que puede afectar la cuantificación de los alelos, especialmente en el caso de niveles mutacionales bajos. En estos casos, las frecuencias medidas en el rango del LOD (Tabla 9) al  $\text{LOD} + 3$  unidades porcentuales no pueden constituir una base sólida para determinar el estado de la mutación. Se recomienda volver a analizar las muestras con posibles mutaciones de bajo nivel.

**Nota:** las decisiones relativas a la aplicación de tratamientos para pacientes con cáncer no deben basarse únicamente en el estado mutacional del gen BRAF.

**Tabla 9. Valores de los límites LOB y LOD determinados para mutaciones específicas**

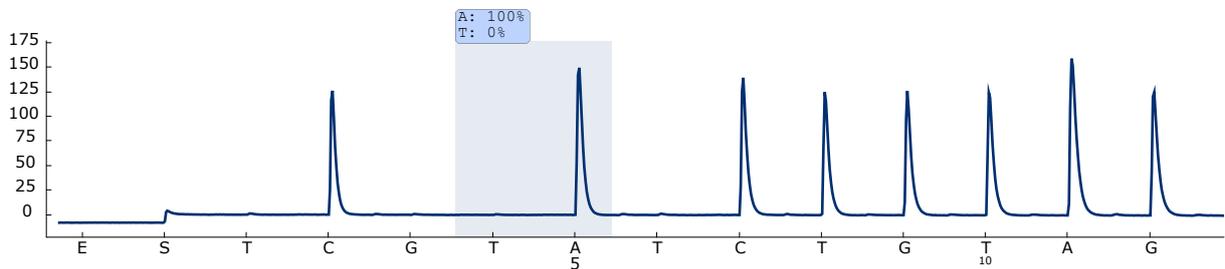
Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LOB (unidades %)	LOD (unidades %)	ID COSMIC* (V46)
<b>Codón 600 (GTG), analizado en sentido inverso (CAC)</b>				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) <sup>†</sup>	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) <sup>†</sup>	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplejo	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
<b>Codón 469 (GGA), analizado en sentido inverso (TCC)</b>				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
<b>Codón 466 (GGA), analizado en sentido inverso (TCC)</b>				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
<b>Codón 464 (GGA), analizado en sentido inverso (TCC)</b>				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

\* Del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) del Instituto Sanger [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

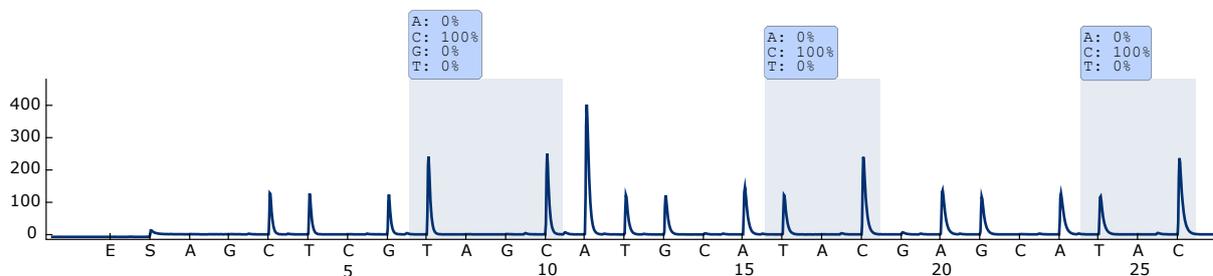
<sup>†</sup> Nivel de mutación mínimo de una muestra que da lugar a una medición de frecuencia  $\geq$  LOD.

## Resultados representativos

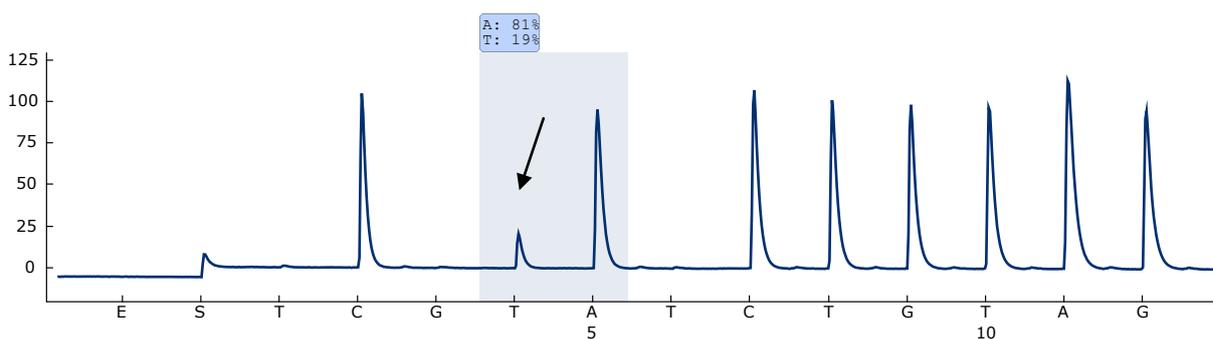
Los resultados representativos del pirograma se muestran en las Ilustraciones 8-10.



**Ilustración 8.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo en el codón 600 utilizando el valor CWCTGTAGC para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).



**Ilustración 9.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo en los codones 464-469 utilizando el valor CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).



**Ilustración 10.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar muestras con una mutación GTG → GAG (V600E) en la base 2 del codón 600 (nucleótido 1799, señalado con una flecha) utilizando el valor CWCTGTAGC para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).

## Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede resultarle de utilidad para resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de Preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de Servicio Técnico (Technical Support Center):

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en la contraportada o en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Nota:** consulte el manual de usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) para solucionar problemas de índole general del equipo.

### Comentarios y sugerencias

---

#### Señales en el control sin molde (control negativo)

- |                                  |   |
|----------------------------------|---|
| a) Interferencias entre pocillos | La señal de un pocillo se detecta en el pocillo situado al lado. No coloque las muestras con una intensidad de señal elevada junto a los pocillos de control sin molde. |
| b) Contaminación de la PCR       | Utilice puntas de pipeta estériles con filtros. No conserve ni extraiga determinados materiales (muestras, controles y amplicones) junto a los reactivos para PCR.      |

#### Secuencia débil o no esperada

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| a) ADN genómico de baja calidad | Un ADN genómico de baja calidad puede impedir que se realice el proceso de PCR. Analice las muestras de PCR mediante una técnica electroforética (por ejemplo, con el sistema avanzado de QIAxcel <sup>®</sup> o mediante electrofóresis en geles de agarosa). |
|---------------------------------|--|

## Comentarios y sugerencias

---

### Resultado "Check" (Revisar) o "Failed" (Errónea)

- a) Altura de pico baja
- La manipulación de errores durante la configuración de la PCR o la preparación de las muestras previa a la pirosecuenciación puede generar picos bajos.
- Es importante que la herramienta de vacío succione totalmente las muestras. Procure que la herramienta de vacío descienda lentamente hacia las muestras y que la orientación de la placa de PCR o las tiras utilizadas para la inmovilización permita la succión total de las muestras.
- Realice regularmente la prueba de funcionamiento de las sondas de filtros tal como se describe en el manual de usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) y sustitúyalas según se indique.
- Si aparece la advertencia "Check" (Revisar), compare con detenimiento el pirograma con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana del pirograma. Si los picos medidos coinciden con la altura de las barras del histograma, el resultado puede considerarse válido. De lo contrario, se recomienda volver a analizar la muestra.
- b) Mutación no definida en "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar)
- Ajuste la secuencia que se debe analizar en la configuración del ensayo (véase "Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* BRAF Pyro", página 50) y vuelva a analizar la serie.
- c) Mutación poco frecuente no prevista
- Un valor "Check" (Revisar) o "Failed" (Errónea) para la valoración de la calidad puede ser debido a un patrón de picos no esperado. Esta situación puede indicar una mutación no esperada y que, por lo tanto, no se analiza si se utiliza el valor indicado para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar). Estas muestras deberían analizarse utilizando los valores alternativos para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) teniendo en cuenta las mutaciones no previstas.

## Comentarios y sugerencias

---

- d) Advertencia de desviación elevada en la altura del pico para una dispensación
- Compare el pirograma detenidamente con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana de pirograma. Si los picos medidos no coinciden con la altura de las barras del histograma y dicha diferencia no se debe a mutaciones poco frecuentes, se recomienda volver a analizar la muestra.
- e) Mensaje de advertencia "High peak height deviation" (Desviación elevada de la altura de pico) para la dispensación 6 con el ensayo del codón 600 y el valor CAYCTGTAGC para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar)
- Compare el pirograma detenidamente con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana de pirograma. Si el ruido de fondo durante la dispensación T6 está por debajo del nivel esperado y los picos medidos restantes coinciden con la altura de las barras del histograma, se pueden ignorar tanto la advertencia como los valores "Check" (Revisar) o "Failed" (Errónea) de la valoración de calidad.
- f) Mensaje de advertencia "High peak height deviation" (Desviación elevada de la altura de pico) para la dispensación 3 ó 4 con el ensayo del codón 600 y el valor CVCTGTAGC para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar)
- Compare el pirograma detenidamente con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana de pirograma. Si el ruido de fondo durante la dispensación G3 o T4 está por debajo del nivel esperado y los picos medidos restantes coinciden con la altura de las barras del histograma, se pueden ignorar tanto la advertencia como los valores "Check" (Revisar) o "Failed" (Errónea) de la valoración de calidad.

## Comentarios y sugerencias

---

- g) Mensaje de advertencia "The sequence contains less reference peaks than required" (La secuencia contiene menos picos de referencia de los necesarios) en el ensayo del codón 600 cuando se utiliza el valor CVCTGTAGC para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar)
- Si los picos medidos coinciden con la altura de las barras del histograma, se puede ignorar la advertencia y el valor "Check" (Revisar) de la valoración de calidad.

### Fondo elevado

- a) Almacenamiento incorrecto de los nucleótidos
- Conserve los nucleótidos a 2-8 °C. Su almacenamiento a una temperatura comprendida entre -15 y -25 °C puede provocar un aumento del fondo.
- b) Tiempo de enfriamiento demasiado corto antes de realizar el análisis de pirosecuenciación
- Mantenga las muestras en un soporte para placas PyroMark Q24 a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. No reduzca el tiempo de enfriamiento.
- c) Contaminación del cartucho
- Limpie con cuidado el cartucho tal como se describe en la hoja del producto. Conserve el cartucho protegido de la luz y el polvo.

### Ausencia de señales en los controles positivos (ADN de control no metilado)

- a) Mezcla de enzimas o de sustratos insuficiente para todos los pocillos
- Asegúrese de llenar el cartucho PyroMark Q24 según la información de "Pre Run Information" (Información previa de la serie) que encontrará en el menú "Tools" (Herramientas).
- b) Reactivos guardados o diluidos incorrectamente
- Prepare los reactivos *therascreen* según las instrucciones descritas en el apartado "Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24", en la página 28.

## Comentarios y sugerencias

---

- |  |  |
|--|--|
| c) Error de la PCR o de la preparación de las muestras | La manipulación de errores durante la configuración de la PCR, la programación del termociclador para PCR o la preparación de muestras previa al análisis de pirosecuenciación pueden provocar la ausencia de señales. Realice regularmente la prueba de funcionamiento de las sondas de filtros tal como se describe en el manual de usuario del PyroMark Q24 ( <i>PyroMark Q24 User Manual</i> ) y sustitúyalas según sea necesario. Repita la PCR y el análisis de pirosecuenciación. |
|--|--|

## Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *therascreen* BRAF Pyro se analiza para comprobar las especificaciones predeterminadas y garantizar una calidad uniforme de los productos.

## Limitaciones

La interpretación de los resultados de diagnóstico obtenidos debe realizarse en combinación con otros resultados clínicos o de laboratorio.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN.

## Características de rendimiento

### Límite de blanco y límite de detección

Se ha determinado el límite de blanco (LOB) y el límite de detección (LOD) de una serie de mutaciones utilizando mezclas de plásmidos (Tabla 10). Los límites LOB y LOD se han determinado según las recomendaciones de los requerimientos EP17-A del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI), "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline". Los errores  $\alpha$ - y  $\beta$ - (falsos positivos y falsos negativos respectivamente) se establecieron en un 5%. Los valores del LOB representan la frecuencia medida obtenida con una muestra nativa. Los valores del LOD representan la señal más baja (frecuencia medida) que puede considerarse positiva para la mutación correspondiente.

### Las mutaciones (GTG $\rightarrow$ GGG) y (GTG $\rightarrow$ GCG) en el codón 600 y (GGA $\rightarrow$ GAA) en el codón 464

Para estas mutaciones, bien las mediciones del blanco eran repetidamente muy próximas a 0 unidades porcentuales ( $n = 72$ ), lo que daba lugar a una distribución no gaussiana, bien las mediciones de las muestras con niveles bajos de mutación mostraban una distribución no gaussiana. Por lo tanto, el LOD se determinó con un método distinto, conforme a las recomendaciones de los requerimientos EP17-A del CLSI. La señal más baja que indica la presencia de una mutación (LOD) en estas posiciones se ha establecido en 2 unidades porcentuales por encima del nivel de referencia respectivo definido por el percentil 95 de las mediciones del blanco. Al analizar una muestra con el nivel de mutación indicado entre paréntesis en la Tabla 10, el 95% de los resultados ( $n=72$ ) obtuvieron una señal que puede considerarse positiva ( $\geq$  LOD).

**Tabla 10. Valores de los límites LOB y LOD determinados para mutaciones específicas**

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LOB (unidades %)	LOD (unidades %)	ID COSMIC* (V46)
<b>Codón 600 (GTG), analizado en sentido inverso (CAC)</b>				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) <sup>†</sup>	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) <sup>†</sup>	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplejo	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
<b>Codón 469 (GGA), analizado en sentido inverso (TCC)</b>				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
<b>Codón 466 (GGA), analizado en sentido inverso (TCC)</b>				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
<b>Codón 464 (GGA), analizado en sentido inverso (TCC)</b>				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

\* Del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) del Instituto Sanger [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

<sup>†</sup> Nivel de mutación mínimo de una muestra que da lugar a una medición de frecuencia  $\geq$  LOD.

**Nota:** estos valores se basan en series analíticas en las que se utilizaron mezclas de plásmidos que incluían la secuencia nativa o mutada correspondiente como molde para la amplificación mediante PCR.

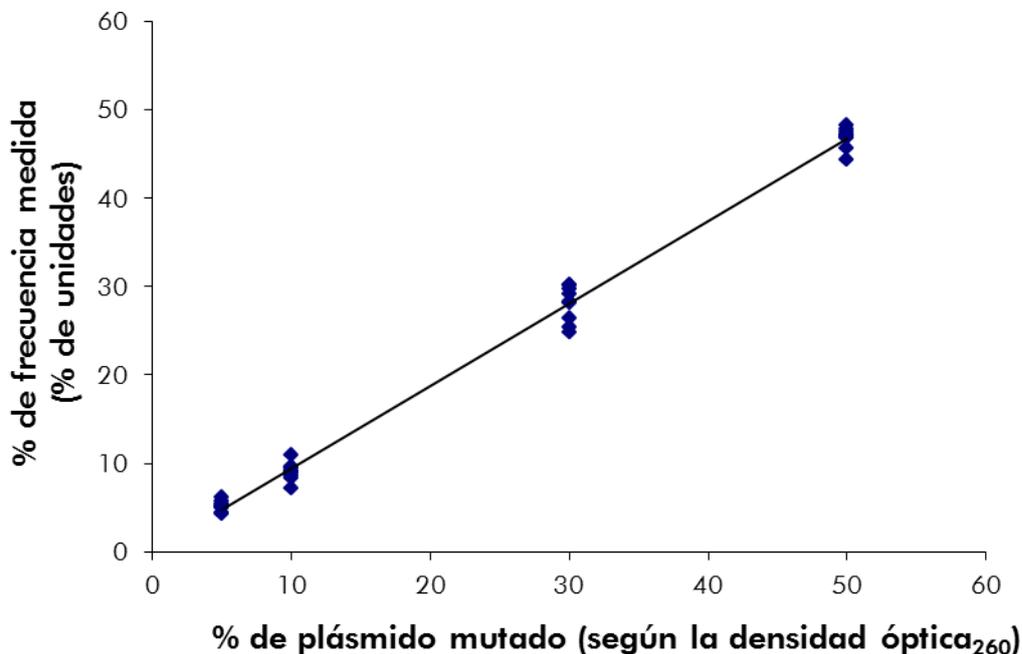
**Nota: se recomienda la confirmación del método de rendimiento en el laboratorio.**

### Linealidad

La linealidad se ha determinado mediante mezclas de plásmidos que contenían la secuencia nativa o mutada de la mutación V600E (GTG → GAG) en el codón 600 del gen BRAF. Los plásmidos se mezclaron en diferentes proporciones hasta obtener cuatro niveles de mutación (5, 10, 30 y 50%). Se analizó cada mezcla con tres lotes distintos del kit *therascreen* BRAF Pyro en tres análisis de pirosecuenciación con tres réplicas cada uno.

Los resultados (n=9 para cada nivel de mutación) se analizaron según la directriz EP6-A del CLSI "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Evaluación de la linealidad de procedimientos de medición cuantitativa: un enfoque estadístico; directriz aprobada) con el software Analyse-it® v2.21, resultados que se muestran en la Ilustración 11 para la mutación V600E (GTG → GAG) en el codón 600.

Los resultados fueron lineales dentro de una no linealidad permitida de 5 unidades porcentuales del intervalo analizado con un nivel de mutación comprendido entre el 5 y el 50%.



**Ilustración 11. Linealidad de la mutación V600E (GTG → GAG) en el codón 600.**

## Precisión

Los datos de precisión que permiten determinar la variabilidad total de los ensayos se obtuvieron de tres niveles distintos del análisis de las mezclas de plásmidos mencionadas anteriormente con tres réplicas cada una.

La repetibilidad (variabilidad intraensayo e interlote) se calculó a partir de los datos obtenidos para la determinación de la linealidad (tres análisis realizados el mismo día con diferentes lotes del kit *therascreen* BRAF Pyro). La precisión intermedia (variabilidad intralaboratorio) se determinó en tres análisis realizados en un único laboratorio en tres días distintos y con usuarios, sistemas PyroMark Q24 y lotes del kit *therascreen* BRAF Pyro diferentes. La reproducibilidad (variabilidad interlaboratorio) se calculó a partir de dos análisis realizados cada uno en un laboratorio interno y en otro externo y utilizando lotes diferentes del kit *therascreen* BRAF Pyro.

Las estimaciones de precisión se expresan en forma de desviación estándar de las frecuencias de mutación medidas en unidades porcentuales (Tabla 11). Los valores de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad para la mutación V600E (GTG → GAG) en el codón 600 fueron de 0,6-2,1, 0,7-1,8 y 0,8-2,1 unidades porcentuales respectivamente en el intervalo medido con un nivel de mutación comprendido entre el 5 y el 50%.

**Tabla 11. Linealidad de la mutación V600E (GTG → GAG) en el codón 600\***

% de plásmido mutado <sup>†</sup>	Repetibilidad		Precisión intermedia		Reproducibilidad	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
5	5,2	0,6	4,4	0,7	5,1	0,8
10	9,1	1,0	9,6	1,0	9,6	1,3
30	28,1	2,1	27,9	1,8	28,3	2,1
50	46,9	1,2	46,3	1,5	47,9	1,7

\* Todos los valores se indican como en unidades porcentuales. SD: desviación estándar (n=9).

<sup>†</sup> Según la medición de la densidad óptica OD<sub>260</sub>.

## Evaluación diagnóstica

La evaluación del kit *therascreen* BRAF Pyro se ha realizado mediante una comparación con el método de secuenciación Sanger. Se extrajo ADN de 100 muestras de tumores de la piel fijadas en formalina e impregnadas en parafina (FFPE) y se analizaron en busca de mutaciones en el codón 600 y los codones 464-469.

El ADN se aisló mediante el kit QIAamp DNA FFPE Tissue. El análisis de pirosecuenciación se llevó a cabo mediante el kit *therascreen* BRAF Pyro en el sistema PyroMark Q24 y la secuenciación Sanger, en el ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

De las 100 muestras analizadas, se pudo determinar el estado mutacional del codón 600 y de los codones 464-469 de todas las muestras con la secuenciación Sanger y de 99 muestras con el kit *therascreen* BRAF Pyro (Tabla 12 y Tabla 13).

En cuatro de las 100 muestras se detectó una mutación V600E (GTG → GAG) mediante secuenciación Sanger. Tres de estas muestras presentaron resultados idénticos con el kit *therascreen* BRAF Pyro, mientras que una de las muestras dio un resultado erróneo en el análisis de pirosecuenciación del codón 600 provocado por picos bajos. En el ensayo de los codones 464-469, esta muestra presentó bastantes picos considerablemente más bajos que otras muestras, lo que sugiere que la calidad del ADN era baja. Ninguno de los dos métodos detectó las mutaciones poco frecuentes en los codones 464-469.

Al excluir la muestra que resultó errónea en un método, la concordancia de resultados entre el kit *therascreen* BRAF Pyro y la secuenciación Sanger fue del 100% tanto para el codón 600 como para los codones 464-469 (Tablas 12 y 13).

**Tabla 12. Resultados de las muestras de tumores de la piel analizadas en el codón 600**

		Secuenciación Sanger			
		Mutante	Nativa	Desconocido	Total
Kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro	Mutante	3	0	0	3
	Nativa	0	96	0	96
	Desconocida	1	0	0	1
	Total	4	96	0	100

**Tabla 13. Resultados de las muestras de tumores de piel analizadas en los codones 464-469**

		Secuenciación Sanger			
		Mutante	Nativa	Desconocida	Total
Kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro	Mutante	0	0	0	0
	Nativa	0	99	0	99
	Desconocida	0	1	0	1
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>99</b>	<b>0</b>	<b>100</b>

**Nota:** en todas las series analíticas utilizadas para la determinación de las características de rendimiento, el nivel de señal fue superior a 30 RLU, valores obtenidos de forma rutinaria a partir de 10 ng de ADN aislado de tejido fijado en formalina e impregnado en parafina (FFPE). Los datos de la pirosecuenciación se analizaron mediante BRAF Plug-in Report.

## Referencias

QIAGEN mantiene una extensa base de datos en línea y actualizada de publicaciones científicas en las que se utilizan los productos de QIAGEN. Sus exhaustivas opciones de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante la búsqueda sencilla con una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica en línea de QIAGEN en [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) o póngase en contacto con los servicios técnicos de QIAGEN o con su distribuidor local.

## Símbolos

Los símbolos siguientes pueden aparecer en el embalaje y las etiquetas:



Contiene suficientes reactivos para <N> pruebas

<N>



Fecha de caducidad



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



N.º de referencia



Número de lote



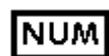
Número de material



Componentes



Contenido



Número



Hidróxido de sodio



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso

## Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visite nuestro Centro de servicio técnico en el sitio [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), o bien póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos del servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* BRAF Pyro

Si se ha instalado BRAF Plug-in Report, encontrará las configuraciones de ensayo predefinidas para los codones 600 y 464-469 en el navegador de accesos directos del software PyroMark Q24, en la ruta "Example Files/PyroMark Setups/BRAF". No es necesario llevar a cabo los siguientes pasos. Puede obtener BRAF Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Se recomienda utilizar BRAF Plug-in Report en lugar de efectuar un análisis manual. Las mutaciones complejas no pueden añadirse manualmente a "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar), por lo que deben analizarse con el complemento. Una vez instalado el complemento o cada vez que actualice un software o instale uno nuevo en el ordenador del laboratorio, deberá comprobar el funcionamiento correcto del mismo tal como se describe en el documento BRAF Plug-In Quick-Start Guide (Guía rápida del complemento BRAF).

Si BRAF Plug-in Report no se ha instalado, el archivo de ensayo debe configurarse manualmente antes de ejecutar el ensayo de pirosecuenciación del kit *therascreen* BRAF Pyro por primera vez. Configure el ensayo para el codón 600 y los codones 464-469 de BRAF mediante el software PyroMark Q24 tal como se describe a continuación.

### Procedimiento

#### Codón 600 de BRAF

**A1.** Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione "New AQ Assay" (Nuevo ensayo AQ).

**A2.** Escriba la siguiente secuencia en "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).

**CWCTGTAGC**

**Nota:** la mutación más frecuente del codón 600 es la mutación GTG → GAG en el nucleótido 1799 (segunda base del codón 600).

El valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) puede modificarse después de la serie para analizar mutaciones en otras posiciones.

Si desea comprobar si existen mutaciones en el nucleótido 1798 (primera posición), modifique el valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) con la siguiente secuencia:

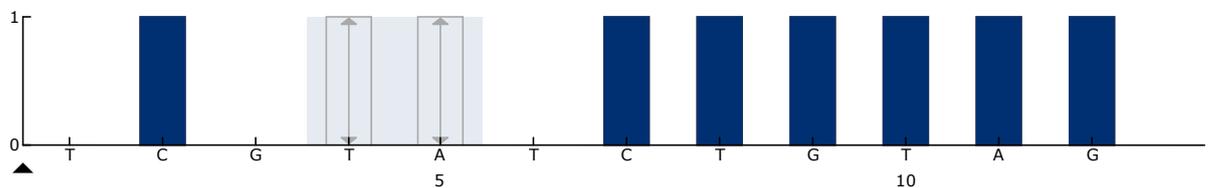
**CAYTGTAGC**

También debería analizarse la secuencia **CVCTGTAGC** de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar) para detectar mutaciones poco frecuentes adicionales del nucleótido 1799.

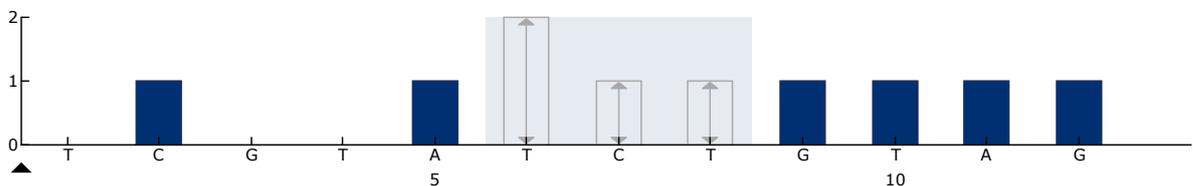
**Nota:** asegúrese de que el umbral para la altura de pico único se haya definido en 30 RLU.

**Nota:** las mutaciones complejas del codón 600 de BRAF no se pueden analizar con el análisis AQ del software PyroMark Q24 mediante “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar). Se recomienda utilizar BRAF Plug-in Report para el análisis de las mutaciones complejas del codón 600.

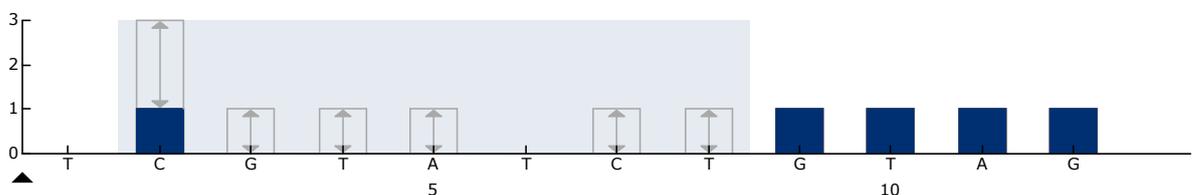
**A3. Introduzca manualmente el siguiente valor para “Dispensation Order” (Orden de dosificación):**  
**TCGTATCTGTAG**



**Ilustración 12. Histograma del codón 600 (nucleótido 1799) con el valor CWCTGTAGC para la opción “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar).**



**Ilustración 13. Histograma del codón 600 (nucleótido 1798) con el valor CAYTGTAGC para la opción “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar).**



**Ilustración 14. Histograma del codón 600 (nucleótido 1799) con el valor CVCTGTAGC para la opción “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar).**

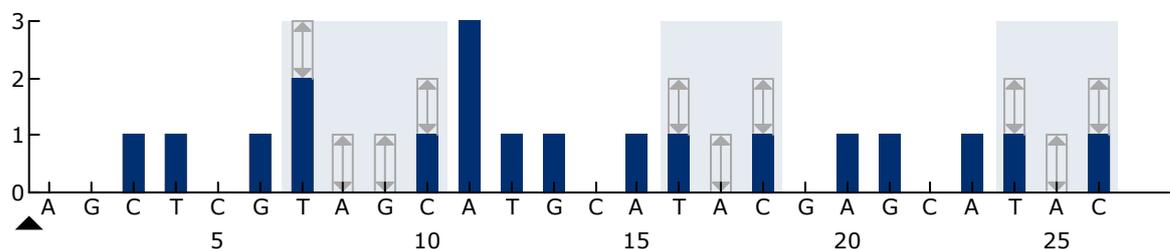
- A4.** Haga clic en la pestaña “Analysis Parameters” (Parámetros de análisis) y aumente el valor de “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Umbral de altura del pico: altura de pico necesaria para calidad garantizada) hasta 30.
- A5.** Haga clic en  en la barra de herramientas y guarde el ensayo como “BRAFcodon 600”.

#### Codón 464-469 de BRAF

- A1.** Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione “New AQ Assay” (Nuevo ensayo AQ).
- A2.** Escriba la siguiente secuencia en “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar):  
**CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA**

**Nota:** la mutación compleja del codón 469 de BRAF no se puede analizar con el análisis AQ del software PyroMark Q24 mediante “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar). Se recomienda utilizar BRAF Plug-in Report para el análisis de la mutación compleja del codón 469.

- A3.** Añada manualmente el siguiente valor para “Dispensation Order” (Orden de dosificación):  
**AGCTCGTAGCATGCATACGAGCATAAC**



**Ilustración 15.** Histograma de los codones 464-469 (nucleótidos 1391 [codón 464], 1397 [codón 466] y 1406 [codón 469]).

- A4.** Haga clic en la pestaña “Analysis Parameters” (Parámetros de análisis) y aumente el valor de “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Umbral de altura del pico: altura de pico necesaria para calidad garantizada) hasta 30.
- A5.** Haga clic en  en la barra de herramientas y guarde el ensayo como “BRAFcodons 464-469”.

## Apéndice B: Vaciado del contenedor de residuos y los contenedores

<p><b>ADVERTENCIA</b></p> 	<p><b>Productos químicos peligrosos</b></p> <p>La solución de desnaturalización que se utiliza con la estación de vacío contiene hidróxido de sodio, sustancia que irrita los ojos y la piel.</p> <p>Utilice siempre gafas de seguridad, guantes y bata de laboratorio.</p> <p>El organismo responsable (p. ej., el director del laboratorio) debe adoptar las precauciones necesarias para garantizar la seguridad del entorno de trabajo y que los usuarios del equipo no estén expuestos a niveles peligrosos de sustancias tóxicas (químicas o biológicas) tal como se define en las Hojas de datos sobre la seguridad (SDS) correspondientes o en los documentos de la OSHA*, ACGIH†, o la COSHH‡.</p> <p>El vertido de humos y la eliminación de residuos se debe realizar de acuerdo con todas las normativas y leyes de salud y seguridad nacionales, estatales y locales.</p>
---	--

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Administración de Seguridad y Salud Ocupacional) (Estados Unidos)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Conferencia de Higienistas Industriales Oficiales de Estados Unidos) (Estados Unidos)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Control de Sustancias Peligrosas para la Salud) (Reino Unido)

Asegúrese de cumplir la normativa medioambiental federal, estatal y local aplicable para la eliminación de los residuos de laboratorio.

### Cuestiones importantes antes de comenzar

- Este protocolo requiere el uso de agua ultrapura.

### Procedimiento

- B1. Asegúrese de que no se aplique vacío a la herramienta de preparación de vacío. Asegúrese de que el vacío está cerrado (Off) y de que la bomba de vacío está desconectada.**
- B2. Elimine las soluciones restantes en los contenedores.**
- B3. Lave los contenedores con agua ultrapura o, si es necesario, sustitúyalos.**

**B4. Vacíe el contenedor de residuos.**

**Nota:** el tapón puede extraerse sin desconectar el tubo.

**B5. Si es preciso limpiar la estación de vacío (por ejemplo, por la presencia de polvo o líquido derramado), siga las instrucciones del manual de usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).**

## Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	Para 24 reacciones en sistemas PyroMark Q24: primers de secuenciación, primers de PCR, ADN de control no metilado, mezcla maestra para PCR PyroMark, concentrado CoralLoad, tampón de unión PyroMark, tampón de hibridación PyroMark, solución de desnaturalización PyroMark, tampón de lavado PyroMark, mezcla de enzimas, mezcla de sustratos, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP y H <sub>2</sub> O	971470
PyroMark Q24 MDx	Plataforma para la detección de secuencias mediante piro-secuenciación de 24 muestras en paralelo	9001513
PyroMark Q24	Plataforma para la detección de secuencias mediante pirosecuenciación de 24 muestras en paralelo	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Estación de vacío (220 V) para la preparación de 24 muestras en paralelo, desde el producto de PCR al molde monocatenario	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Estación de vacío (220 V) para la preparación de 24 muestras en paralelo, desde el producto de PCR al molde monocatenario	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Software de la aplicación	9019063
PyroMark Q24 Software	Software de análisis	9019062

\* Solamente Reino Unido

† Resto del mundo

<b>Producto</b>	<b>Contenido</b>	<b>Referencia</b>
<b>Accesorios</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reacción para secuenciación de 24 pocillos	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para la dosificación de nucleótidos y reactivos	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas con filtro reutilizables para las estaciones de vacío PyroMark Q96 y Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Para la comprobación de la instalación del sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para la confirmación del rendimiento del sistema	979304
<b>Productos relacionados</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparados de ADN: 50 columnas QIAamp MinElute®, proteinasa K, tampones, tubos de recogida (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Para 48 preparados: cartuchos de reactivos (tejido), puntas con filtro desechables, soportes de puntas desechables, tubos de muestras (2 ml), tubos de dilución (1,5 ml), tampón G2, proteinasa K	953034

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de usuario o el manual de uso del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ABI™ (Life Technologies); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag (Florida Scientific Services, Inc.); Windows® (Microsoft Corporation).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

#### **Renuncia de responsabilidad**

No debe utilizarse para determinar el riesgo de desarrollo de endometriosis.

#### **Acuerdo de licencia limitada**

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del kit *therascreen* BRAF Pyro la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit *therascreen* BRAF Pyro debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con el *Manual de uso del kit therascreen BRAF Pyro* y solo para uso con los componentes que se incluyen en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en el *Manual de uso del kit therascreen BRAF Pyro* y en protocolos adicionales disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Estos kits y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario de los kits aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual con relación a este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, reservados todos los derechos.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

**Korea (South)** ■ techservice-kr@qiagen.com

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

