

Manual de instruções do kit *therascreen*[®] BRAF Pyro[®]



Versão 2

IVD

Para utilização de diagnóstico *in vitro*



REF

971470



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALEMANHA

R2

MAT

1074213PT



Tecnologias de amostras e testes da QIAGEN

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostras e testes, permitindo isolar e detectar o conteúdo de qualquer amostra biológica. Os avançados produtos e serviços de elevada qualidade da nossa empresa garantem o sucesso, desde a amostra até ao resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Testes de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microRNA e RNAi
- Automatização de tecnologias de amostras e testes

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite-nos em www.qiagen.com.

Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação	4
Princípio do procedimento	5
Materiais fornecidos	7
Conteúdo do kit	7
Materiais necessários mas não fornecidos	9
Advertências e precauções	11
Informações de segurança	11
Precauções gerais	11
Armazenamento e manuseamento de reagentes	13
Armazenamento e manuseamento de amostras	13
Procedimento	14
Isolamento de ADN	14
■ Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24	15
■ Protocolo 2: PCR utilizando os reagentes fornecidos com o kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro	18
■ Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho	21
■ Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24	23
■ Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24	28
■ Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24	31
Interpretação de resultados	34
Interpretação de resultados da análise e detecção de mutações de baixo nível	34
Guia de resolução de problemas	38
Controlo de qualidade	41
Limitações	42
Características de desempenho	42
Bibliografia	47
Símbolos	47
Informações de contacto	48
Anexo A: Preparação de ensaios <i>therascreen</i> BRAF Pyro	49
Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos	52
Informações para encomendar	54

Utilização prevista

O kit *therascreen* BRAF Pyro é um teste de detecção *in vitro* de ácido nucleico com base em sequências, baseado em Pyrosequencing[®], para a detecção quantitativa de mutações nos códãos 600 e 464 a 469 do gene humano BRAF no ADN genómico derivado de amostras de tecido humano.

O kit *therascreen* BRAF Pyro destina-se a fornecer aos médicos informações para ajudar na selecção de doentes com cancro com maior probabilidade de beneficiar de terapias anti-EGFR. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Apenas para utilização no sistema PyroMark[®] Q24. Os sistemas PyroMark Q24 incluem o seguinte:

- O equipamento PyroMark Q24 e o equipamento PyroMark Q24 MDx.
- A estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 e a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 MDx.
- O software de PyroMark Q24 (versão 2.0) e o software de PyroMark Q24 MDx (versão 2.0).

O produto deve ser utilizado por utilizadores profissionais, como técnicos e médicos especializados em procedimentos de diagnóstico *in vitro*, em técnicas de biologia molecular e no sistema PyroMark Q24.

Resumo e explicação

O kit *therascreen* BRAF Pyro é utilizado para as medições quantitativas das mutações no códão 600 do exão 15 e nos códãos 464 a 469 do exão 11 do gene humano BRAF (Figura 1).

Exão 15	ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTC TAGCTACA GTG AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGT TGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
Exão 11	AAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCTGAT GGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATT GGA TCT GGA T CATT T GGA ACA GTCTACAAGGGAAAGTGGCATG

Figura 1. Contexto genómico das regiões sequenciadas do gene humano BRAF (Ensembl ID ENSG00000157764). Os códãos 600, 464, 466 e 469 são indicados por quadrados.

O kit consiste em dois ensaios: um para a detecção de mutações no códão 600 e o outro para a detecção de mutações nos códãos 464 a 469 (Figura 2). As duas regiões são amplificadas em separado por PCR e sequenciadas pela região definida. As sequências em redor das posições

definidas servem como picos de normalização e de referência para a quantificação e avaliação da qualidade da análise.

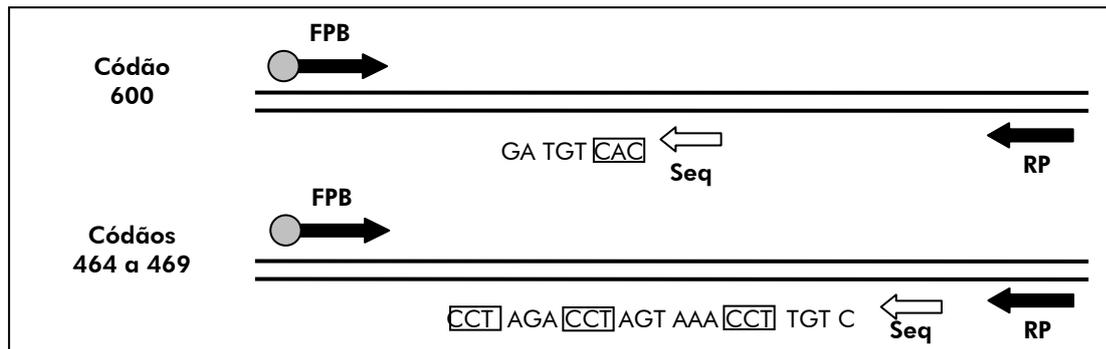


Figura 2. Ilustração do ensaio de BRAF. A sequência indicada é a sequência analisada para uma amostra *wild type*. **FPB**: Iniciadores PCR para a frente (B indica biotinilação); **RP**: Iniciadores de PCR de inversão; **Seq**: Iniciadores de sequenciação.

Ambos os ensaios são sequenciados na direção inversa.

O produto consiste numa mistura de iniciadores de PCR e num iniciador de sequenciação para cada ensaio. Os iniciadores são fornecidos em solução. Cada frasco contém 24 µl de cada iniciador ou mistura de iniciadores.

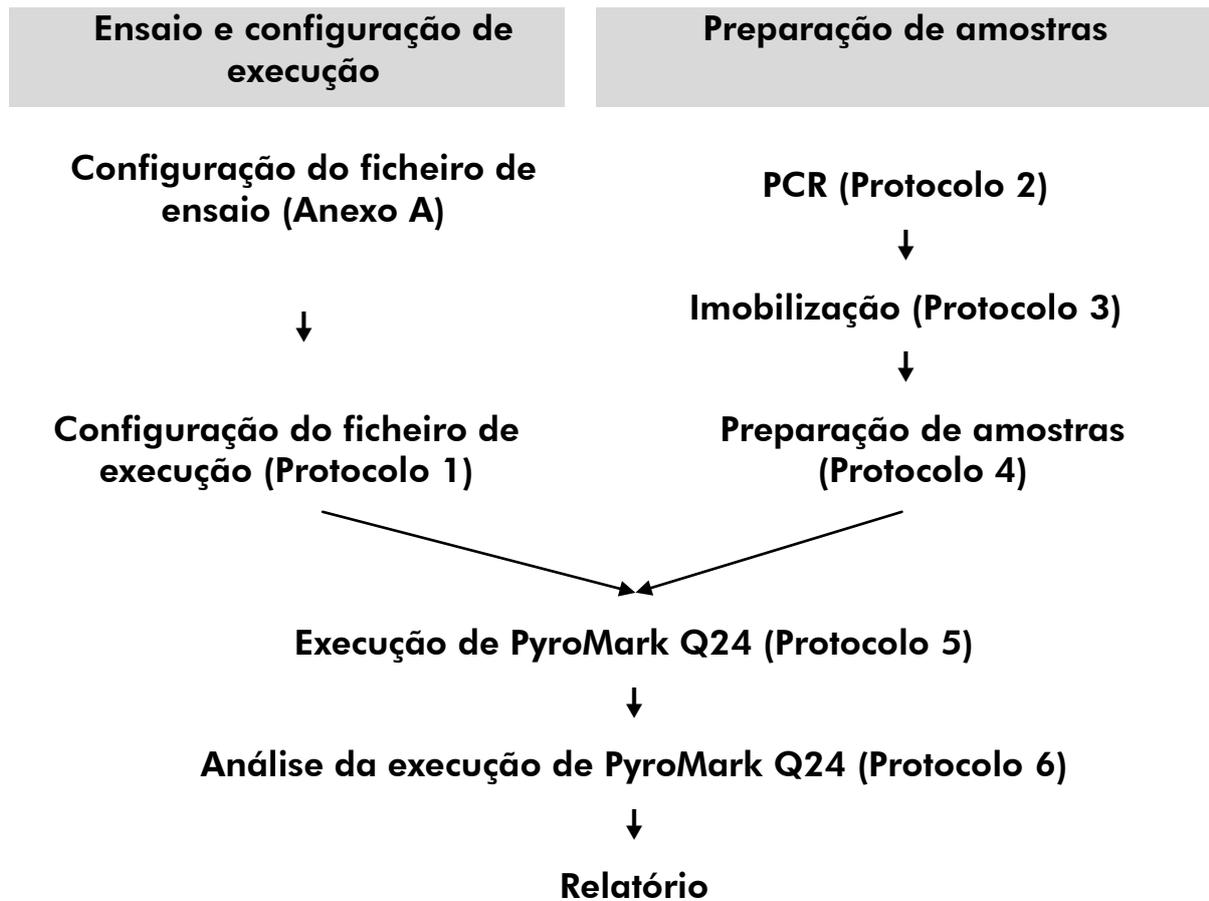
Princípio do procedimento

O fluxo de trabalho na página 6 ilustra o procedimento de ensaio. Depois de a PCR usar iniciadores que visam o códon 600 e os códonos 464 a 469, os amplicons são imobilizados em bandas de Streptavidin Sepharose[®] High Performance. É preparado ADN de cadeia simples e os iniciadores de sequenciação correspondentes são hibridizados para o ADN. Em seguida, as amostras são analisadas no PyroMark Q24, utilizando um ficheiro de configuração de execução e um ficheiro de execução.

Recomenda-se a utilização do BRAF Plug-in Report para analisar a execução. O BRAF Plug-in Report pode ser obtido por e-mail a partir de pyro.plugin@qiagen.com. Contudo, a execução também pode ser analisada utilizando a ferramenta de análise que faz parte integrante do sistema PyroMark Q24. A “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) pode ser ajustada para a detecção de mutações raras após a execução (consultar “Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24”, na página 31).

Nota: O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado à versão anterior do *Manual de instruções do kit theascreen BRAF Pyro* (versão 1, Julho de 2011). Consultar “Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho”, na página 21, “Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24”, na página 23 e “Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24”, na página 31.

Fluxo de trabalho do procedimento de *therascreen* BRAF Pyro



Controlos

O ADN de controlo não metilado está incluído no kit como um controlo positivo da PCR e reacções de sequenciação. Este ADN de controlo tem um genótipo *wild type* nas regiões sequenciadas utilizando este kit e é necessário para a interpretação adequada dos resultados e a identificação de mutações de nível baixo (consultar "Interpretação de resultados", na página 34). Incluir uma amostra com ADN de controlo não metilado para cada ensaio de cada execução de piro-sequenciação.

Além disso, deve ser incluído um controlo negativo (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR para pelo menos um ensaio.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

therascreen BRAF Pyro Kit (caixa 1/2)

<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	(24)
Ref.^o	971470
Número de reacções	24
Seq Primer BRAF 600 (Iniciador de Seq Primer BRAF 600)	24 µl
Seq Primer BRAF 464–469 (Iniciador de Seq BRAF 464 a 469)	24 µl
PCR Primer BRAF 600 (Iniciador de PCR BRAF 600)	24 µl
PCR Primer BRAF 464–469 (Iniciador de PCR BRAF 464 a 469)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (Mistura principal de PCR PyroMark, 2x)	850 µl
CoralLoad [®] Concentrate, 10x (Concentrado CoralLoad [®] , 10x)	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (ADN de controlo não metilado, 10 ng/µl)	100 µl

Soluções tampão e reagentes *therascreen* (caixa 2/2)

Soluções tampão e reagentes	
PyroMark Binding Buffer (Tampão de ligação PyroMark)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Tampão de "annealing" PyroMark)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution* (Solução de desnaturação PyroMark)	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (Tampão de lavagem PyroMark, 10x)	25 ml
Enzyme Mixture (Mistura de enzimas)	1 frasco
Substrate Mixture (Mistura de substrato)	1 frasco
dATP α S	1180 μ l
dCTP	1180 μ l
dGTP	1180 μ l
dTTP	1180 μ l
<i>therascreen BRAF Pyro Kit Handbook</i> (inglês)	1

* Contém hidróxido de sódio.

Materiais necessários mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (MSDS) apropriadas, disponíveis no fornecedor do produto.

- Kit de isolamento de ADN (consulte “Isolamento de ADN”, na página 14)
 - Pipetas (ajustáveis)*
 - Pontas de pipeta esterilizadas (com filtros para configuração de PCR)
 - Microcentrifugadora de bancada*
 - Termociclador* e tubos de PCR adequados
 - Estreptavidina Sepharose High Performance (GE Healthcare, ref.º 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
 - PyroMark Q24 (Ref.º 9001513 ou 9001514)*†
 - Software de PyroMark Q24 (ref.º 9019063 ou 9019062)†
 - Placa PyroMark Q24 (ref.º 979301)†
 - Cartucho de PyroMark Q24 (ref.º 979302)†
 - Estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 (ref.º 9001515 ou 9001517)*†
 - Misturador de placa* para a imobilização de bandas
 - Bloco de aquecimento* capaz de atingir os 80 °C
 - Placa de PCR de 24 poços ou tiras
 - Tampas de tiras
 - Água de grande pureza (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou equivalente).
- Nota:** É fornecida água suficiente no kit para a PCR, a imobilização de ADN e para dissolver a mistura de enzimas e a mistura de substrato; é necessária água adicional de grande pureza para diluir o tampão de lavagem PyroMark, 10x.
- Etanol (70%)‡

* Certifique-se de que os equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

† Com símbolo CE-IVD, conforme a directiva europeia 98/79/CE. Todos os outros produtos apresentados não têm o símbolo CE-IVD, com base na directiva europeia 98/79/CE.

‡ Não utilizar álcool desnaturado, que contém outras substâncias como o metanol ou o metil-etil-cetona.

Misturadores de placas recomendados

Os misturadores de placas indicados na Tabela 1 são recomendados para utilização com o kit *therascreen* BRAF Pyro.

Tabela 1. Misturadores de placas recomendados para utilização com o kit *therascreen* BRAF Pyro

Fabricante	Produto	Ref. ^o
Eppendorf	Thermomixer comfort (dispositivo básico)	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 poços recomendadas

As placas de 24 poços indicadas na Tabela 2 são recomendadas para utilização com o kit *therascreen* BRAF Pyro.

Tabela 2. Placas de 24 poços recomendadas para utilização com o kit *therascreen* BRAF Pyro

Fabricante	Produto	Ref. ^o
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

Advertências e precauções

Informações de segurança

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (MSDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as MSDS de cada kit QIAGEN e componente do kit.

As seguintes frases de riscos e de segurança aplicam-se a componentes do kit *therascreen* BRAF Pyro.

PyroMark Denaturation Solution



Atenção! Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Pode ser corrosivo para os metais. Absorver o produto derramado a fim de evitar danos materiais. Conservar unicamente no recipiente de origem. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

PyroMark Enzyme Mixture



Contém: (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Perigo! Provoca irritação cutânea. Provoca lesões oculares graves. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. EM CASO DE exposição ou preocupação: contactar um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENO ou um médico. Retirar a roupa contaminada e lavar-lo antes de reutilizar. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

PyroMark Substrate Mixture



Contém: acetic acid. Atenção! Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. Retirar a roupa contaminada e lavar-lo antes de reutilizar. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

Precauções gerais

Nota: O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- É necessário o cumprimento estrito do manual de utilizador para a obtenção de resultados optimizados. Não se recomenda a diluição de reagentes não descritos neste manual pois pode resultar numa redução do seu desempenho.
- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado (consultar “Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho” (página 21), “Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24” (página 23) e “Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24”, página 31) quando comparado à revisão R1 do Manual de instruções do Kit *therascreen* BRAF Pyro.
- Os componentes deste produto são suficientes para executar 24 reacções em até 5 execuções independentes.
- Utilize pontas de pipeta esterilizadas com filtros (para configuração da PCR).
- Armazene e extraia materiais positivos (amostras, controlos positivos e amplicons) separadamente de todos os reagentes restantes e adicione-os à mistura de reacção numa instalação em separado.
- Descongele completamente todos os componentes à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar um ensaio.
- Quando estiver descongelado, misture os componentes (pipetando repetidamente para cima e para baixo ou agitando em vortex) e centrifugue com brevidade.
- Resultados falhados não são uma base para uma decisão de estado de mutação.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

O kit *therascreen* BRAF Pyro é transportado em duas caixas. O kit *therascreen* BRAF Pyro (caixa 1/2) é transportada em gelo seco. A mistura principal de PCR PyroMark, o concentrado CoralLoad, o ADN de controlo não metilado e todos os iniciadores devem ser armazenados entre -30 e -15 °C, logo após a chegada.

As soluções tampão e os reagentes *therascreen* (caixa 2/2) que contêm soluções tampão, mistura de enzimas, mistura de substrato, dATP α S, dCTP, dGTP e dTTP (os reagentes para análise de piro-sequenciação) são transportados em embalagens refrigeradas. Estes componentes devem ser armazenados entre 2 e 8 °C, logo após a chegada. Para minimizar a perda de actividade, é aconselhável manter a mistura de enzimas e a mistura de substrato nos frascos fornecidos.

As misturas de enzimas e de substrato reconstituídas permanecem estáveis durante, pelo menos, 10 dias entre 2 e 8 °C. As misturas de enzimas e de substrato reconstituídas podem ser congeladas e armazenadas nos seus frascos entre -30 e -15 °C. Os reagentes congelados não devem ser sujeitos a mais de 3 ciclos de congelamento/descongelamento.

Nota: Os nucleótidos não devem ser congelados.

O kit *therascreen* BRAF Pyro mantém-se estável até à data de prazo de validade do kit, quando armazenado nestas condições.

Armazenamento e manuseamento de amostras

Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente infeccioso.

O material das amostras é ADN humano extraído de amostras fixadas em formalina e conservadas em parafina (FFPE).

Procedimento

Isolamento de ADN

O desempenho do sistema foi estabelecido através do kit EZ1[®] DNA Tissue e do kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue para a extracção de ADN humano de amostras de tumor fixadas em formalina e conservadas em parafina.

Os kits QIAGEN[®] apresentados na Tabela 3 são recomendados para a purificação do ADN dos tipos de amostras humanas indicados para utilização com o kit *therascreen* BRAF Pyro. Efectuar a purificação de ADN de acordo com as instruções dos manuais do kits.

Tabela 3. Kits de purificação de ADN recomendados para utilização com o kit *therascreen* BRAF Pyro

Material de amostra	Kit de isolamento do ácido nucleico	Ref.^o (QIAGEN)
Tecido conservado em parafina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	Kit EZ1 DNA Tissue (48)*	953034

* Siga o protocolo para a utilização de tecido conservado em parafina. O kit EZ1 DNA Tissue deve ser utilizado em conjunto com o EZ1 Advanced (ref.^o 9001410 ou 9001411) e o cartão EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (ref.^o 9018298), com o EZ1 Advanced XL (ref.^o 9001492) e o cartão EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (ref.^o 9018700), ou com o BioRobot[®] EZ1 (ref.^o 9000705; já não está disponível) e o cartão EZ1 DNA Paraffin Section Card (ref.^o 9015862).

Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24

Aspecto importante antes do início do procedimento

- Se necessário, o LOB pode ser confirmado utilizando uma amostra *wild type* para gerar uma placa inteira de resultados. Para mais informações, consulte a directriz EP17-A do CLSI “Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (Protocolo para a determinação dos limites de detecção e limites de quantificação; directriz aprovada).

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Se o EGFR Plug-in Report não tiver sido instalado, crie uma configuração de ensaio (consultar o Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* BRAF Pyro”, na página 49). Isto tem de ser feito apenas uma vez, antes de executar o ensaio *therascreen* BRAF Pyro pela primeira vez. No caso do BRAF Plug-in Report estar instalado, estão disponíveis configurações de ensaio predefinidas no browser de atalhos do software PyroMark Q24, no caminho “Example Files/PyroMark Setups/BRAF”. O BRAF Plug-in Report pode ser obtido por e-mail a partir de pyro.plugin@qiagen.com.

Procedimento

1. **Clique em  na barra de ferramentas.**

É criada uma nova execução.

2. **Introduza os parâmetros de execução (consulte “Parâmetros de execução”, página 16).**
3. **Configure a placa, adicionando ensaios para o código 600 e os códigos 464 a 469 aos poços que correspondem às amostras a analisar.**

Nota: Deve ser incluída uma amostra negativa (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR para pelo menos um ensaio.

Nota: Incluir uma amostra com ADN de controlo não metilado para cada ensaio de cada execução de piro-sequenciação (consultar “Controlos”, na página 6).

4. Quando a execução está configurada e pronta a executar no sistema PyroMark Q24, imprima uma lista dos volumes necessários de mistura de enzimas, mistura de substrato e nucleótidos e a configuração da placa. Selecione "Pre Run Information" (Informações de pré-execução) do menu "Tools" (Ferramentas) e, quando o relatório aparece, clique em .
5. Feche o ficheiro de execução e copie-o para um dispositivo de armazenamento de dados USB (fornecido com o sistema), utilizando o Windows® Explorer.

Nota: As informações de pré-execução impressas podem ser utilizadas como modelo para a configuração de amostras (consulte "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho", na página 21).

Para executar a placa no sistema PyroMark Q24, consulte "Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24", na página 28.

Parâmetros de execução

"Run name" (Nome de execução):	O nome da execução é atribuído quando o ficheiro é guardado. Ao mudar o nome do ficheiro também altera o nome da execução.
"Instrument method" (Método do equipamento):	Selecione o método do equipamento de acordo com o cartucho que será utilizado na execução. Consultar as instruções fornecidas com os produtos.
"Plate ID" (ID da placa):	Opcional: Introduza a ID da placa PyroMark Q24.
"Bar code" (Código de barras):	Opcional: Introduza o número de código de barras da placa ou, se tiver um leitor de códigos de barras ligado ao seu computador, coloque o cursor do rato na caixa de texto "Barcode" (Código de barras) (clitando na caixa) e faça a leitura do código de barras.
"Kit and Reagent ID" (ID de reagente e de kit):	Opcional: Introduza o número de lote do kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro a usar. Pode encontrar o número de lote na etiqueta do produto. Nota: Recomenda-se a introdução de ambas as ID's de reagente e do kit, para que seja possível detectar quaisquer problemas inesperados com os reagentes.
Nota de execução:	Opcional: Introduza uma nota sobre os conteúdos ou objectivo da execução.

Adicionar ficheiros de ensaio

Para adicionar um ensaio a um poço, pode:

- Clicar com o botão direito do rato no poço e seleccionar “Load Assay” (Carregar ensaio) no menu de contexto.
- Seleccionar o ensaio no browser de atalhos, clicar e arrastar o ensaio para o poço.

Um poço é codificado com uma cor, de acordo com o ensaio carregado no poço.

Introdução de ID's de amostras e de notas

Para introduzir uma ID de amostra ou nota, seleccione a célula e introduza o texto.

Para editar uma ID de amostra ou nota, seleccione a célula (os conteúdos actuais serão seleccionados) ou faça duplo clique na célula.

Protocolo 2: PCR utilizando os reagentes fornecidos com o kit *therascreen* BRAF Pyro

Este protocolo destina-se à amplificação da PCR de uma região que contém o códon 600 e uma amplificação de PCR em separado de uma região que contém os códon 464 a 469, utilizando o kit *therascreen* BRAF Pyro.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- A polimerase HotStarTaq[®] de ADN na mistura principal de PCR PyroMark necessita de um passo de activação de **15 minutos a 95 °C**.
- Prepare todas as misturas de reacção numa área diferente da utilizada para a purificação de ADN, adicionando o modelo de ADN à PCR, à análise do produto de PCR ou à preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação.
- Utilize pontas descartáveis que contêm filtros hidrofóbicos para minimizar a contaminação cruzada.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Antes de abrir os tubos com iniciadores de PCR, centrifugue com brevidade para assegurar a concentração dos conteúdos no fundo dos tubos.
- Se necessário, ajuste a concentração do controlo e do ADN de amostra para 0,4 a 2 ng/μl.

Procedimento

- 1. Descongele todos os componentes necessários (consultar a Tabela 4).**
Misture bem antes da utilização.
- 2. Prepare uma mistura de reacção para cada iniciador de PCR, definida de acordo com a Tabela 4.**

Geralmente, a mistura de reacção contém todos os componentes necessários para a PCR, excepto a amostra.

Prepare um volume de mistura de reacção superior ao necessário para o número total de ensaios de PCR a efectuar.

Tabela 4. Preparação de mistura de reacção para cada mistura de iniciadores de PCR

Componente	Volume/reacção (µl)
Mistura principal de PCR PyroMark, 2x	12,5
Concentrado CoralLoad, 10x	2,5
Iniciador de PCR BRAF código 600 ou Iniciador de PCR BRAF códigos 464 a 469	1,0
Água (H ₂ O, fornecida)	4,0
Volume total	20,0

3. Misture cuidadosamente a mistura de reacção e distribua 20 µl em cada tubo de PCR.

Não é necessário manter os tubos de PCR no gelo, uma vez que a polimerase HotStarTaq de ADN é inactiva à temperatura ambiente.

4. Adicione 5 µl de modelo de ADN (2 a 10 ng de ADN genómico) aos tubos de PCR individuais (consultar a tabela 5) e misture bem.

Nota: Deve ser incluída uma amostra de controlo negativa (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR para pelo menos um ensaio.

Nota: Incluir uma amostra com ADN de controlo não metilado para cada ensaio de cada execução de piro-sequenciação (consultar “Controlos”, na página 6).

Tabela 5. Preparação de PCR

Componente	Volume/reacção (µl)
Mistura de reacção	20
ADN da amostra	5
Volume total	25

5. Programe o termociclador de acordo com as instruções do fabricante, utilizando as condições descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Protocolo de ciclagem otimizada

			Comentários
Passo de activação inicial:	15 minutos	95 °C	A polimerase HotStarTaq de ADN é activada por este passo de aquecimento.
Ciclagem de 3 passos:			
Desnaturação	20 segundos	95 °C	
Annealing	30 segundos	53 °C	
Extensão	20 segundos	72 °C	
Número de ciclos	42		
Extensão final:	5 minutos	72 °C	

6. Coloque os tubos de PCR no termociclador e inicie o programa de ciclagem.
7. Após a amplificação, continue com "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho", na página 21.

Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho

Este protocolo destina-se à imobilização do modelo de ADN em Estreptavidina Sepharose High Performance (GE Healthcare) antes da análise no sistema PyroMark Q24.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Deixar que todos os reagentes e soluções necessários atinjam a temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado à versão anterior do Manual de instruções do kit *therascreen* BRAF Pyro (versão 1, Julho de 2011, passo 2).

Procedimento

1. **Agite cuidadosamente o frasco que contém Estreptavidina Sepharose High Performance até se tornar numa solução homogénea.**
2. **Prepare uma mistura principal para a imobilização de ADN, de acordo com a Tabela 7. Prepare um volume 10% superior ao necessário para o número total de reacções a efectuar.**

Tabela 7. Mistura principal para a imobilização de ADN

Componente	Volume/reacção (µl)
Estreptavidina Sepharose High Performance	1
Tampão de ligação PyroMark	40
Água (H ₂ O, fornecida)	29
Volume total	70

Nota: Este protocolo aplica-se à Estreptavidina Sepharose High Performance com número de lote 10057037 ou superior. Quando utilizar bandas de Estreptavidina Sepharose High Performance com número de lote inferior a 10057037, o volume utilizado de bandas por amostra deve ser aumentado para 2 µl, ao mesmo tempo que reduz adequadamente o volume de água.

3. **Adicione 70 μ l da mistura principal aos poços de uma placa de PCR de 24 poços ou tiras conforme predefinido na configuração de execução (consulte “Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24”, na página 15).**

4. **Adicione 10 μ l de produto de PCR biotilado do protocolo 2 a cada poço que contém mistura principal, conforme predefinido na configuração da execução (consulte “Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24”, na página 15).**

Nota: O volume total por poço deve ser 80 μ l após a adição da mistura principal e do produto de PCR.

5. **Vede a placa de PCR (ou tiras) com tampas de tiras.**

Nota: Certifique-se de que não são possíveis fugas entre os poços.

6. **Agite a placa de PCR à temperatura ambiente (15 a 25 °C) durante 5 a 10 minutos, a 1400 rpm.**

Nota: Durante este passo, prepare a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 para a preparação de amostras como descrito no Manual de Utilizador do PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

7. **Continue imediatamente com “Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24”, na página 23.**

Nota: As bandas de sefarose depositam-se rapidamente. A captação de bandas deve ser efectuada imediatamente a seguir à agitação.

Se tiver decorrido mais de 1 minuto desde que a placa (ou tiras) foi agitada, agite de novo durante 1 minuto antes da captação das bandas.

Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24

Este protocolo destina-se à preparação de ADN de cadeia simples e à "annealing" (hibridação) do iniciador de sequenciação para o modelo antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- Antes de abrir os tubos com iniciadores de sequenciação, centrifugue com brevidade para assegurar a concentração dos conteúdos no fundo dos tubos.
- Adicione os 2 iniciadores de sequenciação diferentes no mesmo padrão, conforme predefinido para a placa na configuração da execução (consulte "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", na página 15), consoante a região da análise (codão 600 ou códãos 464 a 469).
- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado à versão anterior do *Manual de instruções do kit theascreen BRAF Pyro* (versão 1, Julho de 2011, passo 18). Não reduza o tempo para arrefecer as amostras depois do aquecimento para 80 °C.
- Efectue regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no Manual de Utilizador do PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) e substitua as sondas de filtro quando for indicado.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Coloque um suporte da placa PyroMark Q24 num bloco de aquecimento pré-aquecido a 80 °C, para utilizar no passo 17. Deixe um segundo suporte da placa PyroMark Q24 à temperatura ambiente (15 a 25 °C) para utilizar no passo 18.
- O tampão de lavagem PyroMark é fornecido como um concentrado 10x. Antes da primeira utilização, dilua para uma solução de trabalho de 1x, adicionando 225 ml de água de grande pureza a 25 ml de tampão de lavagem PyroMark 10x (volume final de 250 ml).

Nota: A solução de trabalho de 1x tampão de lavagem PyroMark mantém-se estável entre 2 e 8 °C até ao prazo de validade indicado.

Procedimento

1. **Dilua uma quantidade suficiente de cada iniciador de sequenciação, iniciador de Seq BRAF 600 ou iniciador de Seq BRAF 464–469, em tampão de "Annealing" PyroMark, conforme descrito na Tabela 8.**

Prepare um volume de iniciador de sequenciação diluído superior ao necessário para o número total de amostras a ser sequenciadas (número de amostras + um adicional).

Não dilua e armazene mais iniciador de sequenciação.

Tabela 8. Exemplo de diluição dos iniciadores de sequenciação

Componente	Volume/reacção (µl)	Volume para reacções 9 + 1 (µl)
Iniciador de Seq BRAF 600 ou Iniciador de Seq BRAF 464–469	0,8	8
Tampão de "annealing" PyroMark	24,2	242
Volume total	25	250

2. **Adicione 25 µl do iniciador de sequenciação diluído a cada poço da placa PyroMark Q24, de acordo com a configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", na página 15).**

Nota: Mantenha um dos suportes de placa PyroMark Q24 (fornecidos com a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24) à temperatura ambiente (15–25 °C), e utilize-o como apoio durante a preparação e movimentação da placa.

3. **Coloque a placa de PCR (ou tiras) do protocolo 3 e a placa PyroMark Q24 sobre a mesa de trabalho (Figura 3).**

Inspeccione a placa PCR e certifique-se de que as bandas Sepharose estão na solução.

Nota: Certifique-se de que a placa tem a mesma orientação que tinha quando as amostras foram carregadas.



Figura 3. Colocação da placa de PCR (ou tiras) e da placa PyroMark Q24 na estação de trabalho de vácuo.

- 4. Aplique vácuo à ferramenta ligando o vácuo.**
- 5. Baixe cuidadosamente as sondas de filtro da ferramenta de vácuo na direcção da placa de PCR (ou tiras) para captar as bandas que contêm modelo imobilizado. Mantenha as sondas no lugar durante 15 segundos. Tenha cuidado ao pegar na ferramenta de vácuo.**

Nota: As bandas de sefarose depositam-se rapidamente. Se tiver decorrido mais de 1 minuto desde que a placa (ou tiras) foi agitada, agite de novo durante 1 minuto antes da captação das bandas.

Inspeccione a placa PCR para tirar completamente todas as amostras com a ferramenta de vácuo.

- 6. Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 40 ml de etanol a 70% (Figura 3). Enxagúe as sondas de filtro durante 5 segundos.**
- 7. Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 40 ml de solução de desnaturação (Figura 3). Enxagúe as sondas de filtro durante 5 segundos.**
- 8. Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 50 ml de tampão de lavagem (Figura 3). Enxagúe as sondas de filtro durante 10 segundos.**
- 9. Levante a ferramenta de vácuo para cima e para trás, para além dos 90° na vertical, durante 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Figura 4).**



Figura 4. Ilustração da ferramenta de vácuo levantada acima de 90° na vertical.

10. Enquanto a ferramenta de vácuo é mantida sobre a placa PyroMark Q24, desligue o interruptor de vácuo na ferramenta (Off).
11. Liberte as bandas na placa PyroMark Q24, mergulhando as sondas de filtro no iniciador de sequenciação diluído e movendo a ferramenta cuidadosamente na horizontal.
Nota: Tenha cuidado para não danificar a placa PyroMark Q24 riscando-a com as sondas de filtro.
12. Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém água de grande pureza (Figura 3) e agite-a durante 10 segundos.
13. Lave as sondas de filtro, mergulhando as sondas em água de grande pureza (Figura 3) e aplicando vácuo. Enxagúe as sondas com 70 ml de água de grande pureza.
14. Levante a ferramenta de vácuo para cima e para trás, para além dos 90° na vertical, durante 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Figura 4).
15. Desligue o interruptor de vácuo da ferramenta (Off) e coloque a ferramenta na posição de parque (P).
16. Desligue a bomba de vácuo.
Nota: No final do dia de trabalho, deve-se eliminar os desperdícios líquidos e as soluções restantes e a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 deve ser verificada quanto a poeiras e derramamentos (consulte o anexo B, na página 52).
17. Aqueça a placa PyroMark Q24 com as amostras a 80 °C durante 2 minutos, utilizando o suporte de placa pré-aquecido PyroMark Q24.

- 18. Retire a placa PyroMark Q24 do suporte de placa quente e coloque-a num segundo suporte de placa PyroMark Q24 que foi mantido à temperatura ambiente (15 a 25 °C) para deixar as amostras arrefecer à temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos.**
- 19. Continue imediatamente com “Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24”, na página 28.**

Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24

Este protocolo descreve a preparação e o carregamento dos reagentes PyroMark Gold Q24 no cartucho PyroMark Q24, e o início e a conclusão da execução no PyroMark Q24. Para uma descrição detalhada sobre como configurar uma execução, consulte o Manual de Utilizador do PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

Aspecto importante antes do início do procedimento

- O relatório de informações de pré-execução, que se encontra no menu “Tools” (Ferramentas) na configuração da execução (consultar “Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24”, na página 15), fornece informações sobre o volume de nucleótidos, enzimas e tampão de substrato necessário para uma execução específica.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Ligue o PyroMark Q24. O interruptor está situado na parte traseira do equipamento.

Procedimento

- 1. Dissolva cada enzima liofilizada e as misturas de substrato em 620 µl de água (H₂O, fornecida).**
- 2. Misture, agitando cuidadosamente o frasco.**
Nota: Não misture com agitação forte!
Nota: De forma a assegurar que a mistura está completamente dissolvida, deixe-a à temperatura ambiente (15 a 25 °C) durante 5 a 10 minutos. Certifique-se de que a solução não está turva antes de encher o cartucho PyroMark Q24. Se não utilizar de imediato os reagentes, coloque os frascos de reagente no gelo[§] ou num frigorífico.
- 3. Deixe os reagentes e o cartucho PyroMark Q24 atingirem a temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).**
- 4. Coloque o cartucho PyroMark Q24 com a etiqueta virada para si.**

[§] Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de material de segurança (MSDS) adequadas, disponíveis no fornecedor do produto.

5. **Carregue o cartucho PyroMark Q24 com os volumes adequados de nucleótidos, enzimas e misturas de substrato de acordo com a Figura 5.**

Certifique-se que não são transferidas bolhas de ar da pipeta para o cartucho.



Figura 5. Ilustração do cartucho PyroMark Q24 visto de cima. As anotações correspondem à etiqueta nos frascos de reagente. Adicione mistura de enzimas (**E**), mistura de substrato (**S**) e nucleótidos (**A**, **T**, **C**, **G**) de acordo com a informação do volume indicada no relatório de informações de pré-execução que se encontra no menu “Tools” (Ferramentas) da configuração da execução.

6. **Abra a porta do compartimento dos cartuchos e introduza o cartucho cheio de reagente, com a etiqueta virada para fora. Empurre totalmente o cartucho e, em seguida, empurre para baixo.**
7. **Certifique-se de que a linha está visível à frente do cartucho e feche a porta.**
8. **Abra a estrutura de suporte da placa e coloque a placa no bloco de aquecimento.**
9. **Feche a estrutura de suporte da placa e a tampa do equipamento.**
10. **Introduza o dispositivo de armazenamento de dados USB (que contém um ficheiro de execução) na porta USB, na parte dianteira do equipamento.**

Nota: Não remova o dispositivo de armazenamento de dados USB antes da conclusão da execução.

11. **Selecione “Run” (Execução) no menu principal (com os botões do ecrã ▲ e ▼) e prima “OK”.**
12. **Selecione o ficheiro de execução com os botões do ecrã ▲ e ▼.**
Nota: Para ver os conteúdos de uma pasta, selecione a pasta e prima em “Select” (Seleccionar). Para voltar à vista anterior, prima “Back” (Anterior).
13. **Quando o ficheiro de execução estiver seleccionado, prima “Select” (Seleccionar) para iniciar a execução.**
14. **Quando a execução tiver terminado e o equipamento confirmar que a execução foi guardada no dispositivo de armazenamento de dados USB, prima “Close” (Fechar).**
15. **Remova o dispositivo de armazenamento de dados USB.**
16. **Abra a tampa do equipamento.**

- 17. Abra a porta do compartimento dos cartuchos e retire o cartucho de reagente, levantando-o para cima e puxando-o para fora.**
- 18. Feche a porta.**
- 19. Abra a estrutura de suporte da placa e retire a placa do bloco de aquecimento.**
- 20. Feche a estrutura de suporte da placa e a tampa do equipamento.**
- 21. Elimine a placa e limpe o cartucho, conforme as instruções no folheto do produto fornecido com o cartucho.**
- 22. Analise a execução de acordo com "Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24", na página 31.**

Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24

Este protocolo descreve a análise de mutação de uma execução de BRAF concluída, utilizando o software de PyroMark Q24.

Procedimento

1. **Conecte o dispositivo de armazenamento de dados USB, que contém o ficheiro da execução processada, na porta USB do computador.**
2. **Copie o ficheiro de execução do dispositivo de armazenamento de dados USB para a localização pretendida no computador, usando o Windows Explorer.**
3. **Abra o ficheiro de execução no modo AQ do software PyroMark Q24, seleccionando "Open" (Abrir) no menu "File" (Ficheiro) ou fazendo duplo clique no ficheiro (👉) no browser de atalhos.**
4. **Existem 2 métodos para analisar a execução. Se estiver a utilizar o BRAF Plug-in Report, siga para o passo 5. Se estiver a utilizar a análise AQ como parte integrante do sistema PyroMark Q24, siga para o passo 6.**

Nota: Recomenda-se vivamente a utilização do BRAF Plug-in Report para a interpretação de resultados. O BRAF Plug-in Report pode ser obtido por e-mail a partir de pyro.plugin@qiagen.com. Este relatório garante que os respectivos valores LOD (Tabela 9) e as diferentes "Sequences to Analyze" (Sequências a analisar) são utilizados para detectar automaticamente todas as mutações.

Nota: As mutações complexas nos códãos 600 e 469 do BRAF não podem ser analisadas utilizando a análise AQ no software PyroMark Q24. Recomendamos a utilização do BRAF Plug-in Report para a análise das mutações complexas dos códãos 600 e 469.

Nota: Algumas mutações endereçadas no códão 600, assim como as mutações G469A e G469S, poderão não ser distinguidas com precisão a níveis de mutação inferiores a 10%.

5. **Utilização do BRAF Plug-in Report:**
Para gerar um relatório, seleccione "AQ Add On Reports/BRAF" a partir de "Reports" (Relatórios) no menu (ver Figura 6).

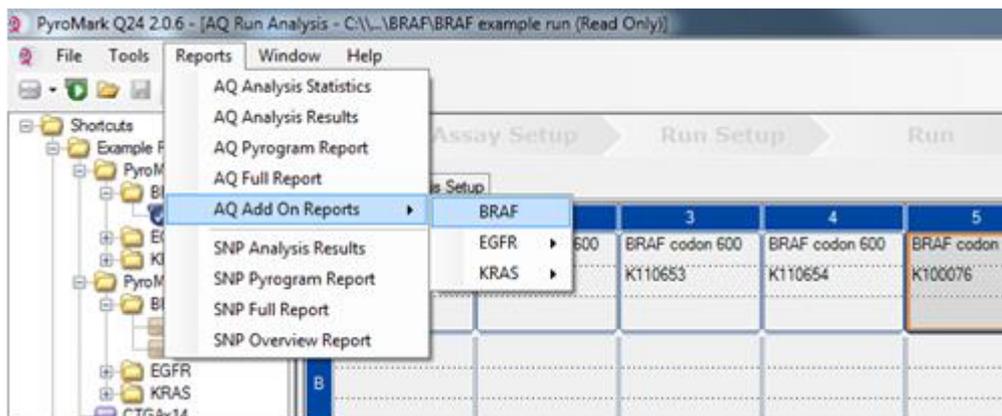


Figura 6. Menu BRAF Plug-in Report.

Os poços serão automaticamente analisados relativamente a todas as mutações para as quais o LOD é indicado na Tabela 9. Os resultados serão apresentados numa tabela de perspectiva geral (Figura 7), seguidos de resultados detalhados que incluem pirogramas e a qualidade de análise.

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.

Figura 7. BRAF Plug-in Report.

6. Utilização da análise AQ:

Para analisar a execução e obter uma perspectiva geral dos resultados, clique num dos botões de Análise.



Analisar todos os poços.



Analisar o poço seleccionado.

Os resultados da análise (frequências dos alelos) e a avaliação de qualidade são apresentados por cima da posição variável, na curva de Pyrogram®. Para mais detalhes sobre como analisar uma execução, consulte o Manual de Utilizador do PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

7. Para criar um relatório, selecione “AQ Full Report” (Relatório completo AQ) ou “AQ Analysis Results” (Resultados de análise AQ) no menu “Reports” (Relatórios).

Nota: Para resultados fiáveis, recomenda-se alturas de picos individuais acima de 30 RLU. Defina 30 RLU como “required peak height for passed quality” (altura de pico necessária para qualidade aprovada) na configuração do ensaio (consultar o anexo A e o Manual de Utilizador do PyroMark Q24 [*PyroMark Q24 User Manual*]).

Nota: O relatório de resultados da análise AQ deve ser utilizado para documentação e interpretação da quantificação dos alelos. Os números apresentados no pirograma são arredondados e não indicam a quantificação exacta.

Nota: O pirograma deverá ser sempre comparado com o histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Os picos medidos deverão corresponder às alturas das barras do histograma.

Nova análise de amostras sem mutações GTG → GAG detectadas ou com avaliação de qualidade “Check” (Verificada) ou “Failed” (Falhada)

A mutação mais frequente no BRAF é a GTG → GAG no nucleótido 1799 (segunda base do códon 600). Por conseguinte, a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) padrão definida na configuração de análise endereça esta mutação (consultar “Anexo A: Preparação de ensaios theascreen BRAF Pyro”, na página 49).

Recomendamos vivamente a repetição da análise de todas as amostras nas quais não tenha sido detectada mutação com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) padrão, assim como das amostras que tenham recebido a avaliação de qualidade “Check” (Verificada) ou “Failed” (Falhada), ou apresentem picos que não correspondam às alturas das barras do histograma. As avaliações de qualidade “Check” (Verificada) e “Failed” (Falhada) poderão indicar uma mutação que não é localizada pela “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) padrão, resultando desvios na altura de picos.

Para reanalisar e detectar mutações no nucleótido 1798 ou 1799 do códon 600, aceda a “Analysis Setup” (Configuração de análise) e altere a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) para uma das “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) indicadas em “Anexo A: Preparação de ensaios theascreen BRAF Pyro”, na página 49. Clique em “Apply” (Aplicar) e, em seguida, clique em “To All” (Para todos), quando aparecer a janela “Apply Analysis Setup” (Aplicar a configuração de análise).

As frequências actualizadas das mutações no gene humano BRAF, no códon 600 e códons 464 a 469 são fornecidas via online pelo Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Nota: Depois de alterar a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar), certifique-se de que o limiar da altura dos picos individuais está definido para 30 RLU.

Nota: Mutações adicionais raras ou não esperadas poderão estar presentes na região sequenciada e poderão ser analisadas utilizando uma “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) alternativa, tendo em conta as mutações não esperadas.

Nota: Se os picos medidos não corresponderem às alturas das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras ou não esperadas, recomenda-se que a amostra seja novamente executada.

Interpretação de resultados

Interpretação de resultados da análise e detecção de mutações de baixo nível

Recomenda-se vivamente a inclusão de ADN de controlo não metilado em todas as execuções, para efeitos de comparação e como controlo de níveis de fundo. A frequência medida da amostra de controlo deverá ser igual ou menor que o limite do branco (LOB).

Todas as amostras deverão ser examinadas em relação ao limite de detecção (LOD, Tabela 9) e interpretadas conforme se segue.

- Frequência de mutação $< \text{LOD}$: Nenhuma mutação detectada
- Frequência de mutação $\geq \text{LOD}$ e $\leq \text{LOD} + 3$ unidades de %: Nível de mutação potencialmente baixo

Nota: Se utilizar o BRAF Plug-in Report (ver passo 5 de “Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24”, na página 28) e isto ocorrer, é emitida uma advertência.

As amostras com uma indicação de nível de mutação potencialmente baixo deverão ser consideradas positivas quanto à mutação, se confirmadas por nova execução em duplicado, juntamente com uma amostra com ADN de controlo não metilado. O resultado de ambos os duplicados deverá ser $\geq \text{LOD}$ e diferente da amostra de controlo. Caso contrário a amostra deverá ser considerada como “No Mutation Detected” (Nenhuma mutação detectada).

- Frequência de mutação $> \text{LOD} + 3$ unidades de %: Mutação

Se estiver a utilizar o BRAF Plug-in Report, isto é efectuado de forma automática.

Nota: Recomenda-se a utilização do BRAF Plug-in Report para a interpretação de resultados. Para um exame mais minucioso das amostras com um nível de mutação indicado como potencialmente baixo, recomenda-se que a amostra seja também analisada manualmente no software da aplicação (por ex., para comparação com a frequência de mutação da amostra de controlo).

Nota: Algumas mutações endereçadas no códdão 600, assim como as mutações G469A e G469S, poderão não ser distinguidas com precisão a níveis de mutação inferiores a 10%.

Nota: Uma frequência medida acima do LOB na amostra de controlo indica um nível de fundo maior que o habitual na respectiva execução que poderá ter impacto na quantificação dos alelos, especialmente para níveis de mutação baixos. Neste caso, as frequências medidas no intervalo de LOD (Tabela 9) até LOD + 3 unidades de % não são uma base para uma decisão do estado de mutação. Recomenda-se que as amostras com um nível de mutação potencialmente baixo sejam novamente executadas.

Nota: Uma decisão de tratamento de doentes com cancro não se deve basear unicamente no estado de mutação do BRAF.

Tabela 9. LOB e LOD determinados para mutações específicas

Substituição de ácido nucleico	Substituição de amino-ácido	LOB (unidades de %)	LOD (unidades de %)	ID COSMIC* (V46)
Códão 600 (GTG), conforme analisado na orientação inversa (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	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
Códão 469 (GGA), conforme analisado na orientação inversa (TCC)				
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
Códão 466 (GGA), conforme analisado na orientação inversa (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Códão 464 (GGA), conforme analisado na orientação inversa (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de Mutações Somáticas no Cancro), disponível online no Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Nível mais baixo de mutação numa amostra que resulta numa frequência medida \geq LOD.

Resultados representativos

Os resultados representativos do pirograma estão apresentados nas Figuras 8 a 10.

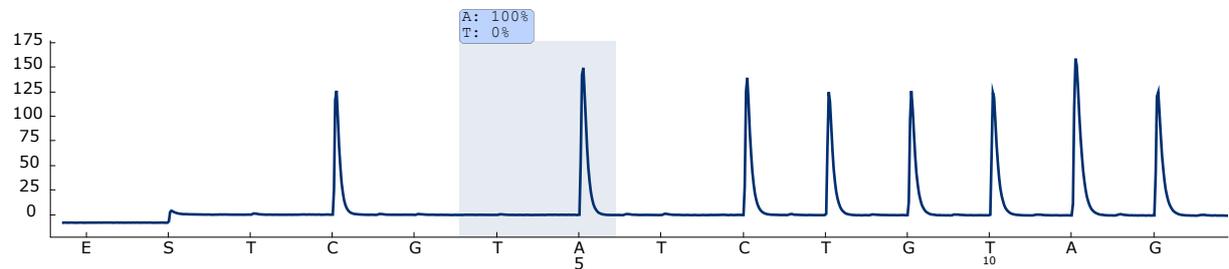


Figura 8. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com um genótipo *wild type* no códão 600 com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) CWCTGTAGC.

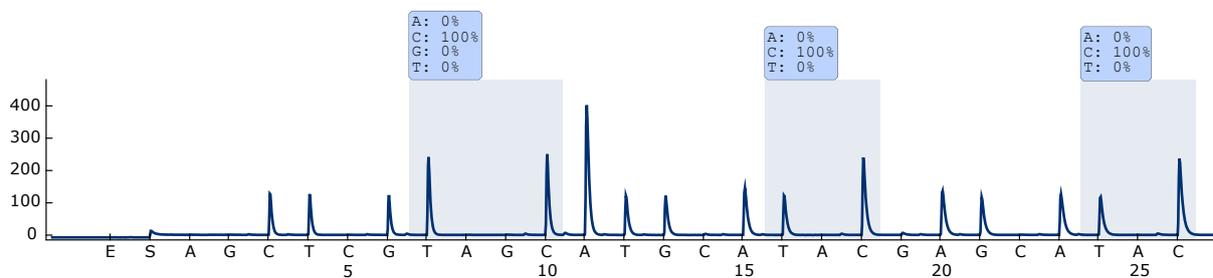


Figura 9. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com um genótipo *wild type* nos códãos 464 a 469 com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA.

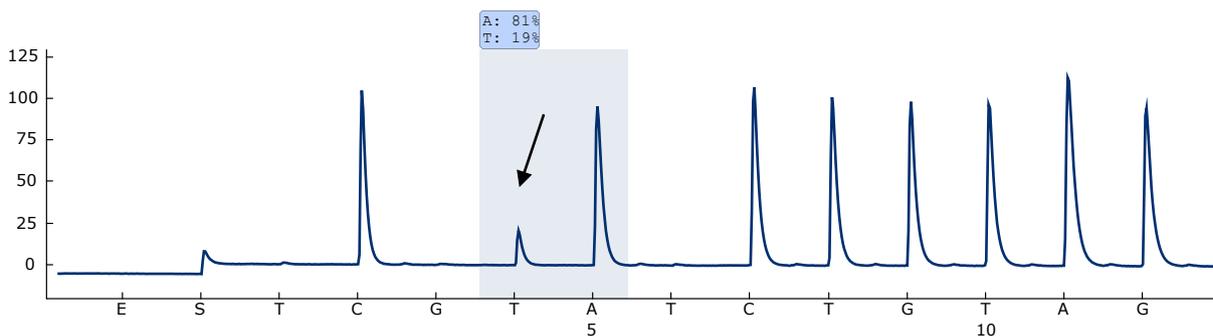


Figura 10. Curva de pirograma obtida após a análise de amostras com uma mutação GTG → GAG (V600E) na base 2 do códão 600 (nucleótido 1799, indicado com uma seta) com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) CWCTGTAGC.

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa ter sobre as informações e protocolos constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostras e testes (para informações de contacto, consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Nota: Consulte o Manual de Utilizador do PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) para resolução de problemas gerais do equipamento.

Comentários e sugestões

Sinais no controlo sem modelo (controlo negativo)

- | | |
|------------------------------|--|
| a) Interferência entre poços | O sinal de um poço é detectado num poço vizinho. Evite colocar as amostras com intensidades de sinal altas junto a poços de controlos sem modelo. |
| b) Contaminação de PCR | Utilize pontas de pipeta esterilizadas com filtros. Armazene e extraia os materiais, como amostras, controlos e amplicons, separadamente dos reagentes de PCR. |

Sequência pobre ou inesperada

- | | |
|------------------------------------|---|
| a) ADN genómico de baixa qualidade | ADN genómico de baixa qualidade pode causar a falha da PCR. Analise as amostras de PCR utilizando uma técnica de electroforese (por exemplo, o sistema QIAxcel [®] Advanced ou a electroforese em gel de agarose). |
|------------------------------------|---|

Comentários e sugestões

Resultado “Check” (Verificado) ou “Failed” (Falhado)

- a) Altura de pico baixa
- Eventuais erros de manuseamento na configuração da PCR ou na preparação de amostras antes da piro-sequenciação podem resultar em picos baixos.
- É importante que as amostras sejam completamente levadas pela ferramenta de vácuo. Tome precauções para que a ferramenta de vácuo seja baixada lentamente nas amostras e que a geometria da placa da PCR ou tiras utilizadas para a imobilização permita que as amostras sejam completamente levadas.
- Efectue regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no Manual de Utilizador do PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) e substitua as sondas de filtro quando for indicado.
- Em caso de um aviso “Check”, compare cuidadosamente o pirograma ao histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Se os picos medidos corresponderem às alturas das barras do histograma, o resultado é válido. Caso contrário, recomenda-se que a amostra seja novamente executada.
- b) Mutação não definida em “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar)
- Ajuste a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) na configuração do ensaio (consultar “Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* BRAF Pyro”, na página 49) e reanalise a execução.
- c) Mutação rara inesperada
- Uma avaliação de qualidade “Check” (Verificada) ou “Failed” (Falhada) pode ser causada por um padrão inesperado de picos. Isto poderá indicar uma mutação inesperada, que não é analisada pela “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) fornecida. Estas amostras devem ser analisadas utilizando a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) alternativa, tendo em conta mutações inesperadas.

Comentários e sugestões

- d) Aviso de desvio da altura de pico alta durante uma distribuição
- O pirograma deverá ser cuidadosamente comparado com o histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Em caso dos picos medidos não corresponderem às alturas das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras, recomenda-se que a amostra seja novamente executada.
- f) Mensagem de aviso "High peak height deviation" (Desvio da altura de pico alta) para a distribuição 6 com o ensaio do código 600 e a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) CAYCTGTAGC
- O pirograma deverá ser cuidadosamente comparado com o histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. No caso do ruído de fundo durante a distribuição T6 estar abaixo do nível esperado e os picos medidos restantes corresponderem às alturas das barras do histograma, o aviso e a avaliação de qualidade "Check" (Verificada) ou "Failed" (Falhada) podem ser ignorados.
- f) Mensagem de aviso "High peak height deviation" (Desvio da altura de pico alta) para a distribuição 3 ou 4 com o ensaio do código 600 e a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) CVCTGTAGC
- O pirograma deverá ser cuidadosamente comparado com o histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. No caso do ruído de fundo durante a distribuição G3 ou T4 estar abaixo do nível esperado e os picos medidos restantes corresponderem às alturas das barras do histograma, o aviso e a avaliação de qualidade "Check" (Verificada) ou "Failed" (Falhada) podem ser ignorados.
- g) Mensagem de aviso "The sequence contains less reference peaks than required" (A sequência contém menos picos de referência que os necessários) surge no ensaio do código 600 com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) CVCTGTAGC
- Em caso dos picos medidos corresponderem às alturas das barras do histograma, o aviso e a avaliação de qualidade "Check" (Verificada) podem ser ignorados.

Comentários e sugestões

Plano de fundo alto

- | | |
|--|---|
| a) Armazenamento incorrecto de nucleótidos | Armazene os nucleótidos entre 2 e 8 °C. O armazenamento entre -15 e -25 °C pode provocar um aumento no plano de fundo. |
| b) Pouco tempo de arrefecimento das amostras antes da análise de piro-sequenciação | Mantenha as amostras num suporte de placa PyroMark Q24 à temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Não reduza o tempo de arrefecimento. |
| c) Contaminação do cartucho | Limpe cuidadosamente o cartucho conforme descrito no folheto do produto. Guarde o cartucho protegido da luz e da poeira. |

Sem sinais nos controlos positivos (ADN de controlo não metilado)

- | | |
|--|--|
| a) Enzima insuficiente ou mistura de substrato para todos os poços | Certifique-se de que enche o cartucho PyroMark Q24 de acordo com as "Pre Run Information" (Informações de pré-execução) no menu "Tools" (Ferramentas). |
| b) Reagentes armazenados ou diluídos incorrectamente | Prepare os reagentes <i>therascreen</i> de acordo com as instruções no "Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24", página 28. |
| c) Falha da PCR ou da preparação da amostra | Eventuais erros de manuseamento na configuração da PCR, na programação do ciclador de PCR ou na preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação podem resultar em falta de sinais. Efectue o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no Manual de Utilizador do PyroMark Q24 (<i>PyroMark Q24 User Manual</i>) e substitua as sondas de filtro quando necessário. Repita a PCR e a análise de piro-sequenciação. |

Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão de Qualidade Total certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do kit *therascreen* BRAF Pyro são testados quanto às especificações predeterminadas, a fim de garantir uma qualidade constante do produto.

Limitações

Todos os resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados em conjunto com outras descobertas clínicas ou laboratoriais.

O utilizador é responsável por validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório que não estejam cobertos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Características de desempenho

Limite do branco e limite de detecção

O limite do branco (LOB) e o limite de detecção (LOD) foram determinados para um número de mutações, utilizando misturas de plasmídeos (Tabela 10). O LOB e o LOD foram determinados de acordo com as recomendações da directriz EP17-A "Protocolo para a determinação dos limites de detecção e limites de quantificação; directriz aprovada" do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os erros α e β (falso positivo e falso negativo, respectivamente) foram definidos para 5%. Os valores de LOB representam a frequência medida obtida com uma amostra de tipo selvagem (wild-type). Os valores de LOD representam o sinal mais baixo (frequência medida) que pode ser observado como positivo para a respectiva mutação.

As mutações (GTG → GGG) e (GTG → GCG) no codão 600 e (GGA → GAA) no codão 464

Para estas mutações, ou as medições do branco estavam consistentemente perto de 0 unidades de % ($n=72$), resultando numa distribuição não-Gaussiana, ou as medições das amostras com níveis baixos de mutação tiveram uma distribuição não-Gaussiana. O LOD foi por conseguinte determinado utilizando um método diferente, de acordo com as recomendações da directriz EP17-A do CLSI. O sinal mais baixo que indica a presença de uma mutação (LOD) nestas posições foi definido para 2 unidades de % acima do respectivo nível da linha de base, conforme definido pelo 95º percentil de medições do branco. Durante a análise de uma amostra com o nível de mutação indicado entre parênteses na Tabela 10, 95% dos resultados ($n=72$) emitiram um sinal que pode ser considerado positivo (\geq LOD).

Tabela 10. LOB e LOD determinados para mutações específicas

Substituição de ácido nucleico	Substituição de amino-ácido	LOB (unidades de %)	LOD (unidades de %)	ID COSMIC* (V46)
Códão 600 (GTG), conforme analisado na orientação inversa (CAC)				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	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
Códão 469 (GGA), conforme analisado na orientação inversa (TCC)				
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
Códão 466 (GGA), conforme analisado na orientação inversa (TCC)				
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
Códão 464 (GGA), conforme analisado na orientação inversa (TCC)				
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de Mutações Somáticas no Cancro), disponível online no Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Nível mais baixo de mutação numa amostra que resulta numa frequência medida \geq LOD.

Nota: Estes valores baseiam-se em execuções em que misturas de plasmídeos que exibem a sequência *wild type* ou a respectiva sequência mutada foram utilizadas como modelo da amplificação de PCR.

Nota: Recomenda-se que o desempenho do método seja confirmado no laboratório.

Linearidade

A linearidade foi determinada utilizando misturas de plasmídeos que exibem a sequência *wild type* ou mutante para a mutação V600E (GTG → GAG) no códon 600 do gene BRAF. Os plasmídeos foram misturados em proporções de modo a serem obtidos 4 níveis de mutação (5, 10, 30 e 50%). Cada mistura foi analisada com 3 lotes diferentes do kit *therascreen* BRAF Pyro, em 3 execuções de piro-sequenciação, com 3 exemplares cada.

Os resultados (n=9 para cada nível de mutação) foram analisados de acordo com a directriz EP6-A do CLSI "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Avaliação da linearidade dos procedimentos de medições quantitativas: uma abordagem estatística; directriz aprovada) utilizando o software Analyse-it® v2.21 e estão indicados na Figura 11 para a mutação V600E (GTG → GAG) no códon 600.

Os resultados foram lineares dentro de uma não linearidade permitida de 5 unidades de % no intervalo testado de 5 a 50% de nível de mutação.

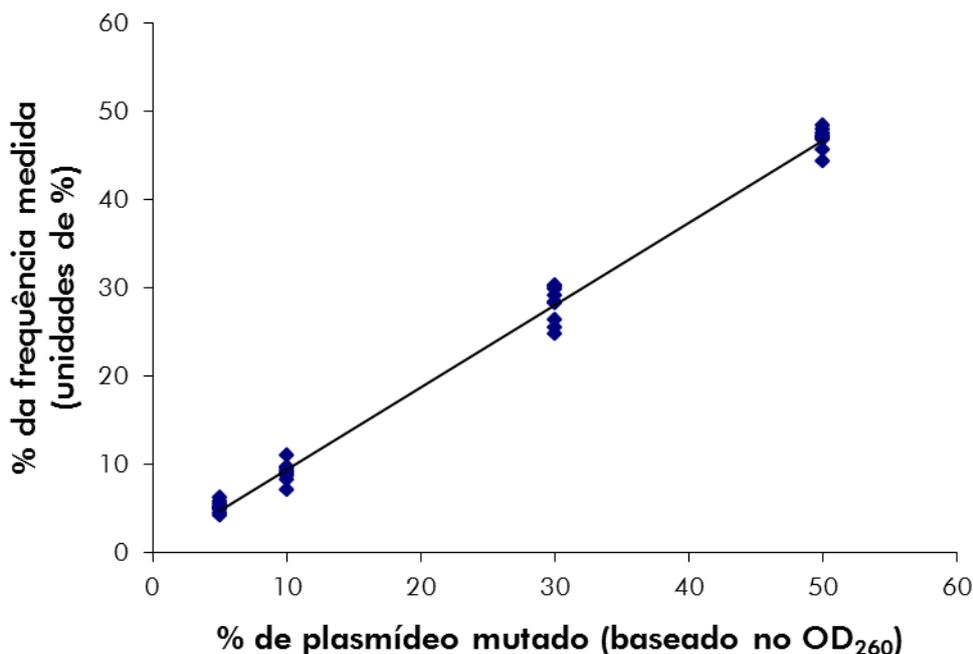


Figura 11. Linearidade da mutação V600E (GTG → GAG) no códon 600.

Precisão

Os dados da precisão permitem a determinação da variação total dos ensaios e foram obtidos a 3 diferentes níveis por análise das misturas de plasmídeos mencionadas acima, com 3 exemplares cada.

A repetitividade (variação intra-ensaio e inter-lotes) foi calculada com base nos dados para a determinação da linearidade (3 execuções no mesmo dia,

utilizando variados lotes do kit *therascreen* BRAF Pyro). A precisão intermédia (variação intra-laboratorial) foi determinada em 3 execuções, em 1 laboratório, em 3 dias diferentes, com vários operadores, sistemas PyroMark Q24 e lotes do kit *therascreen* BRAF Pyro. A reprodutibilidade (variação inter-laboratorial) foi calculada com 2 execuções, cada uma em um laboratório interno e um laboratório externo, e utilizando variados lotes do kit *therascreen* BRAF Pyro.

Os cálculos de precisão são expressos como desvio padrão das frequências de mutação medidas em unidades de % (Tabela 11). A repetitividade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade da mutação V600E (GTG → GAG) no códon 600 foram de, respectivamente, 0,6–2,1, 0,7–1,8 e 0,8–2,1 unidades de %, no intervalo medido de 5 a 50% de nível de mutação.

Tabela 11. Precisão da mutação V600E (GTG → GAG) no códon 600*

% de plasmídeo mutado [†]	Repetitividade		Precisão intermédia		Reprodutibilidade	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
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 os valores são indicados em unidades de %. SD: desvio padrão (n=9).

[†] Baseado em medição do OD₂₆₀.

Avaliação de diagnóstico

O kit *therascreen* BRAF Pyro foi avaliado em comparação com a sequenciação Sanger. Foi extraído o ADN de 100 amostras fixadas em formalina e conservadas em parafina (FFPE) de tumor da pele e analisado quanto a mutações no códon 600 e códon 464 a 469.

O ADN foi isolado utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Foi realizada a análise de piro-sequenciação com o kit *therascreen* BRAF Pyro no sistema PyroMark Q24 e a sequenciação Sanger no ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Das 100 amostras analisadas, foi possível determinar o estado de mutação do códon 600 e dos códon 464 a 469 em todas as amostras e em 99 amostras, respectivamente com a sequenciação Sanger e o kit *therascreen* BRAF Pyro (Tabela 12 e Tabela 13).

Em 4 das 100 amostras, foi detectada uma mutação V600E (GTG → GAG) por sequenciação Sanger. Três dessas amostras tiveram resultados idênticos com o kit *therascreen* BRAF Pyro, enquanto que 1 amostra falhou na análise de piro-

sequenciação do códon 600 devido a picos baixos. No ensaio dos códon 464 a 469, esta amostra tinha picos suficientes mas consideravelmente mais baixos do que outras amostras, indicando que o ADN era de baixa qualidade. Nenhuma das mutações raras dos códon 464 a 469 foi detectada por ambos os métodos.

Excluindo a amostra que falhou em 1 método, o kit *therascreen* BRAF Pyro e a sequenciação Sanger mostraram uma concordância de 100% nos resultados tanto do códon 600 como dos códon 464 a 469 (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12. Resultados das amostras de tumor da pele analisadas para o códon 600

		Sequenciação Sanger			Total
		Mutante	Wild type	Desco- nhecido	
Kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro	Mutante	3	0	0	3
	Wild type	0	96	0	96
	Desco- nhecido	1	0	0	1
	Total	4	96	0	100

Tabela 13. Resultados das amostras de tumor da pele analisadas para os códon 464 a 469

		Sequenciação Sanger			Total
		Mutante	Wild type	Desco- nhecido	
Kit <i>therascreen</i> BRAF Pyro	Mutante	0	0	0	0
	Wild type	0	99	0	99
	Desco- nhecido	0	1	0	1
	Total	0	99	0	100

Nota: Em todas as execuções utilizadas para a determinação das características de desempenho, o sinal era superior a 30 RLU, conforme obtidos rotineiramente de 10 ng de ADN isolado de tecido fixado em formalina e conservado em parafina (FFPE). Os dados de piro-sequenciação foram analisados utilizando o BRAF Plug-in Report.

Bibliografia

A QIAGEN mantém uma vasta base de dados online actualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem-lhe localizar os artigos de que necessita, quer através da pesquisa por uma única palavra-chave, quer especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa da bibliografia, visite a base de dados de referências da QIAGEN online em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer na embalagem e nas etiquetas:



Contém reagentes suficientes para <N> testes

<N>



Prazo de validade



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*



Ref.^o



Número de lote



Número do material



Componentes



Conteúdo



Número



Hidróxido de sódio



Número do item de comércio mundial



Limitação de temperatura



Fabricante



Consultar instruções de utilização

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* BRAF Pyro

No caso do BRAF Plugin Report estar instalado, estão disponíveis configurações de ensaio predefinidas para o código 600 e os códigos 464 a 469 no browser de atalhos do software PyroMark Q24, no caminho "Example Files/PyroMark Setups/BRAF". Não é necessário efectuar os passos seguintes. O BRAF Plug-in Report pode ser obtido por e-mail a partir de pyro.plugin@qiagen.com.

Recomenda-se vivamente a utilização do BRAF Plug-in Report em vez da análise manual. As mutações complexas não podem ser adicionadas manualmente a uma "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) e têm de ser analisadas utilizando o plug-in. Após a instalação do plug-in ou sempre que um novo software é instalado ou actualizado no computador, deve-se verificar o funcionamento correcto do plug-in, conforme descrito no guia rápido do BRAF Plug-In.

Se o BRAF Plug-in Report não tiver sido instalado, o ficheiro de ensaio tem de ser configurado manualmente antes da primeira execução do ensaio *therascreen* BRAF Pyro. Configure o ensaio do código 600 e códigos 464 a 469 de BRAF através do software PyroMark Q24, conforme descrito a seguir.

Procedimento

Código 600 de BRAF

A1. Clique em  na barra de ferramentas e seleccione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).

A2. Digite a sequência seguinte em "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar):
CWCTGTAGC

Nota: A mutação mais frequente no código 600 é uma mutação GTG → GAG no nucleótido 1799 (segunda posição).

A "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) também pode ser alterada após a execução para analisar as mutações nas diferentes posições.

Para verificar se as mutações estão presentes no nucleótido 1798 (primeira posição), altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) para a seguinte sequência:

CAYTGTAGC

Para mutações raras adicionais no nucleótido 1799, também se deve analisar a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) **CVCTGTAGC**.

Nota: Certifique-se de que o limiar da altura de picos singulares está definido para 30 RLU.

Nota: As mutações complexas no códon 600 do BRAF não podem ser analisadas utilizando a análise AQ no software PyroMark Q24 utilizando a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar). Recomendamos a utilização do BRAF Plug-in Report para a análise das mutações complexas do códon 600.

**A3. Introduza manualmente o "Dispensation Order" (Pedido de distribuição) seguinte:
TCGTATCTGTAG**

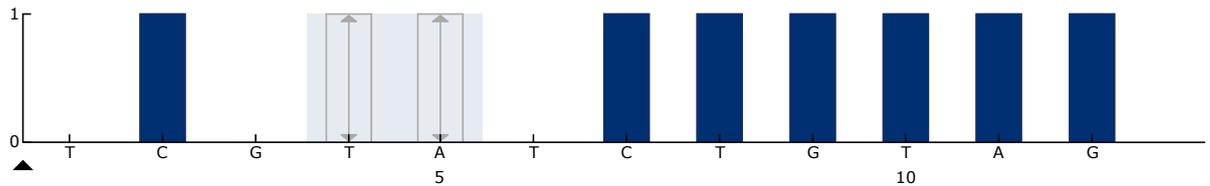


Figura 12. Histograma do códon 600 (nucleótido 1799) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) CWCTGTAGC.

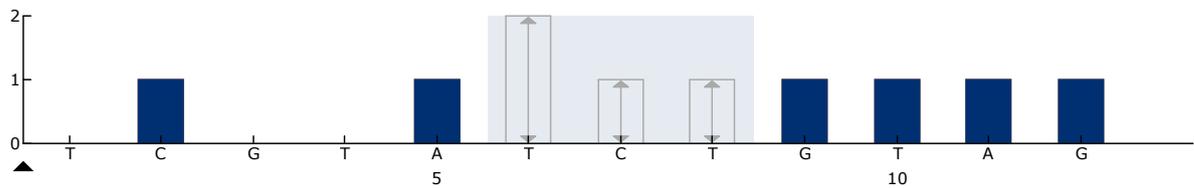


Figura 13. Histograma do códon 600 (nucleótido 1798) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) CAYTGTAGC.

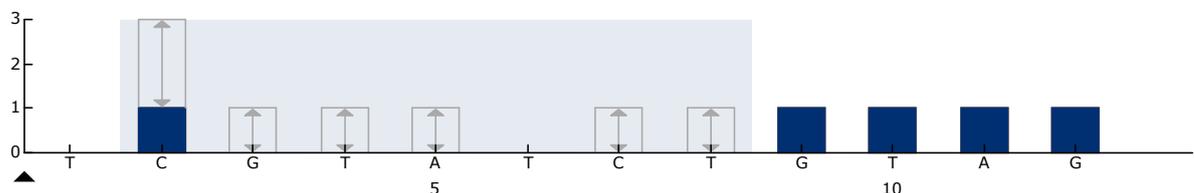


Figura 14. Histograma do códon 600 (nucleótido 1799) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) CVCTGTAGC.

A4. Clique no separador "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente o "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Limiar de altura de pico – altura de pico necessária para qualidade aprovada:) para 30.

A5. Clique em  na barra de ferramentas e guarde o ensaio como "BRAFCodon 600" (Código 600 de BRAF).

Códãos 464 a 469 de BRAF

A1. Clique em  na barra de ferramentas e selecione “New AQ Assay” (Novo ensaio AQ).

A2. Digite a sequência seguinte em “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar):

CTGTTNCAAATGATHCAGATHCA

Nota: A mutação complexa no códão 469 do BRAF não pode ser analisada utilizando a análise AQ no software PyroMark Q24 utilizando a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar). Recomendamos a utilização do BRAF Plug-in Report para a análise da mutação complexa do códão 469.

A3. Adicione manualmente o “Dispensation Order” (Pedido de distribuição) seguinte:

AGCTCGTAGCATGCATACGAGCATAAC

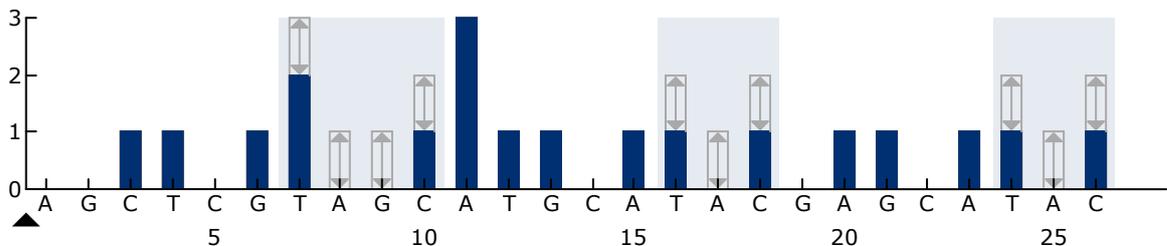


Figura 15. Histograma dos códãos 464 a 469 (nucleótidos 1391 [códão 464], 1397 [códão 466] e 1406 [códão 469]).

A4. Clique no separador “Analysis Parameters” (Parâmetros de análise) e aumente o “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Limiar de altura de pico – altura de pico necessária para qualidade aprovada:) para 30.

A5. Clique em  na barra de ferramentas e guarde o ensaio como “BRAFcodons 464-469” (Códãos 464 a 469 do BRAF).

Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos

<p>ADVERTÊNCIA</p> 	<p>Químicos perigosos</p> <p>A solução de desnaturação utilizada com a estação de trabalho de vácuo contém hidróxido de sódio, que irrita os olhos e a pele.</p> <p>Usar sempre óculos de segurança, luvas e uma bata de laboratório adequada.</p> <p>A entidade responsável (por ex., gestor de laboratório) tem de tomar as precauções necessárias para garantir que o local de trabalho circundante está em segurança e que os operadores do equipamento não são expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas (químicas e biológicas), conforme definido nas fichas de material de segurança (MSDS's) aplicáveis ou nos documentos OSHA*, ACGIH† ou COSHH‡.</p> <p>A ventilação de gases e eliminação de desperdícios tem de estar em conformidade com todos os regulamentos e legislações nacionais, distritais e locais em matéria de saúde e de segurança.</p>
---	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Estados Unidos da América)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Estados Unidos da América)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Reino Unido)

Certifique-se de que observa os regulamentos ambientais federais, distritais e locais relativamente à eliminação de desperdícios laboratoriais.

Aspecto importante antes do início do procedimento

- Este protocolo requer água de grande pureza.

Procedimento

- B1. Assegure-se de que não há vácuo aplicado na ferramenta de vácuo. Certifique-se de que o vácuo está fechado (Off) e que a bomba de vácuo está desligada.**
- B2. Elimine quaisquer soluções que tenham ficado nos depósitos.**
- B3. Lave os depósitos com água de grande pureza ou substitua-os, se necessário.**

B4. Esvazie o recipiente de desperdícios.

Nota: A tampa pode ser retirada sem retirar a tubagem.

B5. Se a estação de trabalho de vácuo tiver de ser limpa (por exemplo, devido a poeiras ou derrames), siga as instruções descritas no Manual de Utilizador do PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

Informações para encomendar

Produto	Conteúdo	Ref. ^g
<i>therascreen</i> BRAF Pyro Kit (24)	Para 24 reacções nos sistemas PyroMark Q24: Iniciadores de Seq, iniciadores de PCR, ADN de controlo não metilado, mistura principal de PCR PyroMark, concentrado CoralLoad, tampão de ligação PyroMark, tampão de "annealing" PyroMark, solução de desnaturação PyroMark, tampão de lavagem PyroMark, mistura de enzimas, mistura de substrato, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP e H ₂ O	971470
PyroMark Q24 MDx	Plataforma de detecção baseada na sequência para a piro-sequenciação de 24 amostras em simultâneo	9001513
PyroMark Q24	Plataforma de detecção baseada na sequência para a piro-sequenciação de 24 amostras em simultâneo	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Estação de trabalho de vácuo (220 V) para preparar 24 amostras em simultâneo, desde o produto de PCR até ao modelo de cadeia simples	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Estação de trabalho de vácuo (220 V) para preparar 24 amostras em simultâneo, desde o produto de PCR até ao modelo de cadeia simples	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Software de aplicação	9019063
PyroMark Q24 Software	Software de análise	9019062
Acessórios		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reacção de sequenciação de 24 poços	979301

* Apenas no Reino Unido

† Restantes países

Produto	Conteúdo	Ref.ª
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para distribuir nucleótidos e reagentes	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas de filtro reutilizáveis para a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q96 e Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Para a verificação da instalação do sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para a confirmação do desempenho do sistema	979304
Produtos relacionados		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparações de ADN: 50 colunas, Proteinase K, soluções tampão, tubos de recolha (2 ml) QIAamp MinElute®	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Para 48 preparações: Cartuchos de reagentes (tecido), pontas com filtros descartáveis, suportes de pontas descartáveis, tubos de amostra (2 ml), tubos de eluição (1,5 ml), tampão G2, Proteinase K	953034

Para informações actualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respectivo manual de instruções do kit QIAGEN ou o manual do utilizador. Os manuais de instruções do kit QIAGEN e os manuais do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Marcas comerciais: 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).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não especificamente indicados como tal, não deverão ser considerados como não protegidos pela legislação.

Exoneração de responsabilidade

Não utilizar na determinação do risco de contrair endometriose.

Contrato de Licença Limitada

A utilização deste produto implica a aceitação por parte de qualquer comprador ou utilizador do kit *therascreen* BRAF Pyro dos seguintes termos:

1. O kit *therascreen* BRAF Pyro pode ser usado unicamente de acordo com o *Manual de instruções do kit therascreen BRAF Pyro* e apenas para a utilização com os componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com quaisquer componentes não incluídos neste kit, salvo descrito em contrário no *Manual de instruções do kit therascreen BRAF Pyro* e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados nem ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou facilitar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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

