

# Manual do PyroMark KRAS Kit



Versão 1



O PyroMark KRAS Kit com a marcação CE-IVD permite a medição quantitativa de mutações nos codões 12, 13 e 61 do gene KRAS humano. Fornece aos médicos informações para os ajudar a seleccionar doentes com cancro colorrectal que tenham maior probabilidade de beneficiar de terapêuticas anti-EGFR.

Para diagnóstico in vitro



971450



1056444PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R2

MAT

1056444PT



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

A QIAGEN é líder em tecnologias inovadoras de amostragem e ensaios, que permitem o isolamento e a detecção do conteúdo de qualquer amostra biológica. Os nossos serviços e produtos avançados e de alta qualidade garantem o sucesso desde a amostra até ao resultado.

### **A QIAGEN estabelece padrões na:**


- purificação de ADN, ARN e proteínas;
- ensaios de ácidos nucleicos e proteínas;
- investigação microARN e ARNi;
- automatização das tecnologias de amostragem e ensaio.

A nossa missão é possibilitar que alcance grandes êxitos e faça novas descobertas. Para mais informações, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Índice

<b>Conteúdo do kit</b>	<b>4</b>
<b>Símbolos</b>	<b>4</b>
<b>Transporte e armazenamento</b>	<b>5</b>
<b>Aplicação</b>	<b>5</b>
<b>Limitações da utilização do produto</b>	<b>6</b>
<b>Assistência técnica</b>	<b>6</b>
<b>Controlo de qualidade</b>	<b>7</b>
<b>Informações sobre segurança</b>	<b>7</b>
<b>Introdução</b>	<b>8</b>
Princípio e procedimento	8
Características do desempenho	9
<b>Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador</b>	<b>14</b>
<b>Observações importantes</b>	<b>15</b>
Precauções gerais	15
Material de amostra	15
Isolamento de ADN	15
Controlos	16
<b>Protocolo 1: Configuração da execução no PyroMark Q24 MDx</b>	<b>17</b>
<b>Protocolo 2: PCR utilizando o HotStarTaq Plus Master Mix Kit e o PyroMark KRAS Kit</b>	<b>19</b>
<b>Protocolo 3: Imobilização dos produtos de PCR nas esferas de Streptavidin Sepharose High Performance</b>	<b>22</b>
<b>Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24 MDx</b>	<b>24</b>
<b>Protocolo 5: Execução no PyroMark Q24 MDx</b>	<b>27</b>
<b>Protocolo 6: Análise de uma execução no PyroMark Q24 MDx</b>	<b>29</b>
<b>Guia de resolução de problemas</b>	<b>34</b>
<b>Apêndice A: Configuração dos ensaios PyroMark KRAS</b>	<b>36</b>
<b>Apêndice B: Esvaziar o recipiente de resíduos e as tinas</b>	<b>38</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>39</b>
<b>Informações sobre encomendas</b>	<b>40</b>

## Conteúdo do kit

<b>PyroMark KRAS Kit</b>	<b>(24)</b>
<b>Ref.</b>	<b>971450</b>
<b>Número de reacções</b>	<b>24</b>
Seq Primer KRAS 12/13	24 µl
Seq Primer KRAS 61	24 µl
PCR Primer KRAS 12/13	24 µl
PCR Primer KRAS 61	24 µl
wt KRAS Control DNA	100 µl
Mutant KRAS Control DNA	100 µl
Manual	 1

## Símbolos



<N>

Contém reagentes para <N> testes



Prazo de validade



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Referência



Número de lote



Número de material



Componentes



Contém



Número



Limites de temperatura



Fabricante legal



Consulte a informação fornecida no manual



Nota importante

## Transporte e armazenamento

O PyroMark KRAS Kit é transportado em gelo seco e, após a chegada, deve ser conservado a -20 °C. A descongelação e congelação repetidas (> 5 x) devem ser evitadas. O PyroMark KRAS Kit permanece estável até ao prazo de validade desde que conservado nestas condições.

## Aplicação

Na Europa, está a ser dada grande atenção à análise da mutação do gene KRAS devido à autorização de introdução no mercado condicional concedida pela Comissão Europeia ao panitumumab e ao cetuximab para tratamento de cancro do cólon metastizado em doentes com gene KRAS sem mutação (tipo selvagem). Significa que o panitumumab e o cetuximab só podem ser administrados a doentes aos quais tenha sido feito o rastreio do estado da mutação do gene KRAS.

A aplicação prevista consiste em ajudar os médicos a identificar os doentes com cancro colorrectal cuja probabilidade de beneficiar de terapêuticas anti-EGFR, tais como o panitumumab e o cetuximab, seja maior. Destina-se a ser utilizado como auxiliar de outros factores de prognóstico actualmente empregues para seleccionar doentes adequados para tratamento com terapêuticas anti-EGFR, com base no estado de mutação dos codões 12, 13 e 61 do gene KRAS do doente. É necessário que o estado de mutação do doente seja considerado juntamente com outros factores de doença para que o médico tome uma decisão sobre a terapêutica. O estado de mutação do gene KRAS não deve ser a única base para uma decisão sobre o tratamento de doentes com cancro.

O produto destina-se a medições quantitativas de mutações nos codões 12, 13 e 61 do gene KRAS humano. O produto consiste em dois ensaios: um ensaio para detectar mutações nos codões 12 e 13 e o segundo para detectar mutações no codão 61. Ambos os ensaios contêm “primers” de PCR específicos e um “primer” de sequenciação.

## Limitações da utilização do produto

Os resultados obtidos com o produto têm de ser interpretados dentro do contexto de todos os achados clínicos e laboratoriais relevantes.

O produto só deve ser utilizado por pessoal com instrução e formação especiais em procedimentos de diagnóstico in vitro e no sistema PyroMark Q24 MDx.

Os estudos de validação foram realizados utilizando ADN humano extraído de amostras de tumor fixadas com formol e impregnadas de parafina.

Os materiais para a purificação de ADN, amplificação por PCR e preparação de amostras para análise Pyrosequencing® não são fornecidos com o produto. O produto foi validado com produtos de purificação de ADN e reagentes de PCR da QIAGEN. Utilize os produtos recomendados de amplificação por PCR e de purificação de ADN especificados nas páginas 14 e 15.

O produto destina-se exclusivamente a ser utilizado no sistema PyroMark Q24 MDx.

É necessária conformidade estrita com o manual do utilizador para que se obtenham resultados óptimos. Não se recomenda a diluição dos reagentes, de outra forma que não a descrita neste manual, pois terá como resultado uma diminuição do desempenho.

Deve-se ter atenção aos prazos de validade e às condições de conservação impressas na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilize componentes fora do prazo ou conservados de forma incorrecta.

## Assistência técnica

Na QIAGEN orgulhamo-nos da qualidade e disponibilidade da nossa equipa técnica. Os nossos departamentos de Assistência Técnica têm cientistas experientes com alargados conhecimentos teóricos e práticas em tecnologias de amostragem e ensaio, assim como na utilização dos produtos QIAGEN. Se tiver alguma dúvida ou se sentir dificuldades com o PyroMark KRAS Kit ou com outros produtos da QIAGEN em geral, não hesite em contactar-nos.

Os clientes da QIAGEN são uma importante fonte de informação relativamente a utilizações avançadas ou especializadas dos nossos produtos. Esta informação é útil para outros cientistas e também para todos os investigadores da QIAGEN. Por este motivo, pedimos-lhe que nos contacte se tiver sugestões acerca do desempenho do produto ou sobre novas aplicações e técnicas.

Para obter assistência técnica e mais informações, contacte o nosso Centro de Assistência Técnica em [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) ou telefone para os Departamentos de Assistência Técnica da QIAGEN ou distribuidores locais (consulte a contracapa ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade com certificação ISO da QIAGEN, cada lote de PyroMark KRAS Kit é testado em relação a especificações predeterminadas de modo a garantir a qualidade consistente do produto.

## Informações sobre segurança

Ao executar tarefas com produtos químicos, usar sempre uma bata laboratorial, luvas descartáveis e óculos protectores adequados. Para mais informações, consulte as material safety data sheets (MSDS) (folhas de dados de segurança dos materiais) adequadas. As folhas estão disponíveis online em formato PDF cómodo e compacto em [www.qiagen.com/support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/support/MSDS.aspx), onde poderá encontrar, visualizar e imprimir a MSDS para cada kit QIAGEN e para cada componente do kit.

### Informações de emergência 24 horas

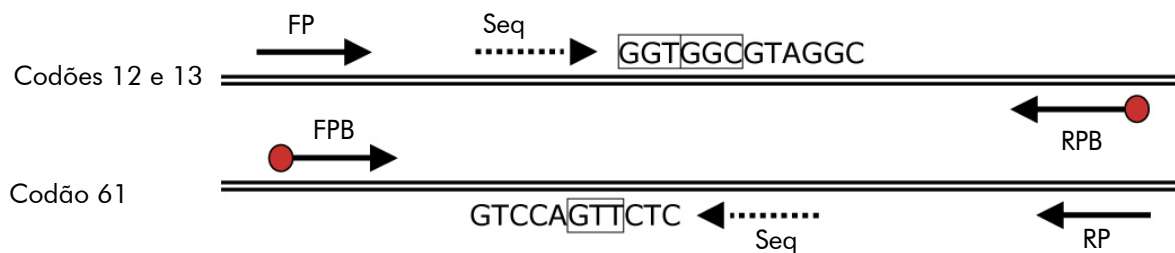
Poderá obter informações médicas de emergência em Inglês, Francês e Alemão, 24 horas por dia, através de:

Die Beratungsstelle bei Vergiftungen (Centro de Informação Anti-venenos)  
Mainz, Alemanha

Tel.: +49-6131-19240

## Introdução

O PyroMark KRAS Kit com a marcação CE-IVD permite medições quantitativas de mutações nos codões 12, 13 e 61 do gene KRAS humano. O produto consiste em dois ensaios: um ensaio para detectar mutações nos codões 12 e 13 e o segundo para detectar mutações no codão 61. As duas regiões são amplificadas em separado por PCR e sequenciadas através da região definida. As seqüências que rodeiam as posições definidas servem como picos de normalização e referência para quantificação e avaliação da qualidade da análise.



**Figura 1. Ilustração do ensaio KRAS.** A seqüência indicada é a seqüência analisada para uma amostra normal. **FP** e **FPB**: “primers” orientados para a frente de PCR (B indica biotinilação), **RP** e **RPB**: “primers” reversos de PCR (B indica biotinilação), **Seq**: “primers” de sequenciação.

ⓘ A sequenciação dos codões 12 e 13 é orientada para a frente, enquanto a do codão 61 é em sentido inverso.

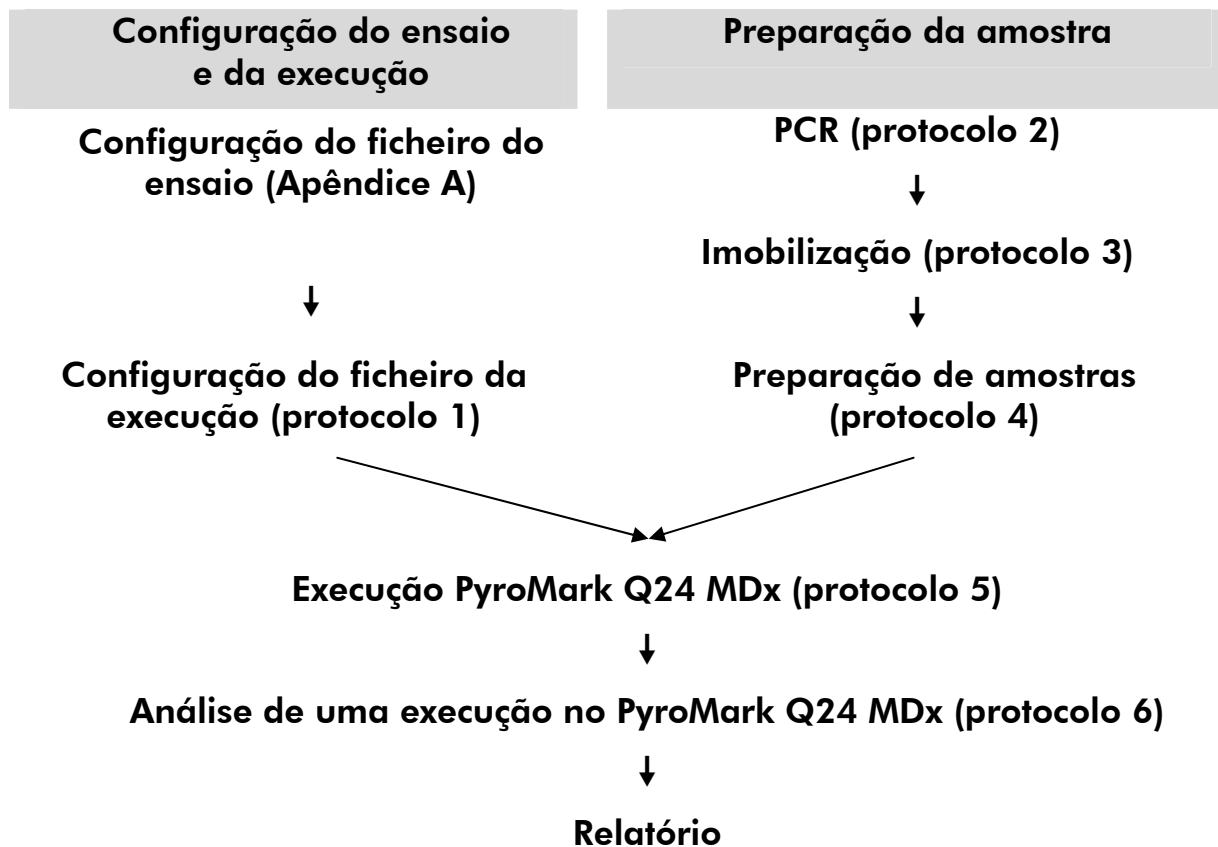
O produto é constituído por uma mistura de “primers” de PCR e um “primer” de sequenciação para cada ensaio. Os “primers” são fornecidos em solução. Cada frasco contém 24 µl de cada “primer” ou da mistura de “primers”.

## Princípio e procedimento

O fluxo de trabalho na página 9 ilustra o procedimento do ensaio. Após a PCR utilizando “primers” que têm como alvo os codões 12/13 e o codão 61, os amplicões são imobilizados em esferas de Streptavidin Sepharose High Performance. É preparado o ADN de cadeia simples e os “primers” de sequenciação correspondentes hibridam-se com o ADN. As amostras são depois analisadas num PyroMark Q24 MDx utilizando um ficheiro da configuração da execução e um ficheiro da execução. Após a execução, a “Sequence to Analyze” (Seqüência a analisar) pode ser ajustada para detecção de mutações raras (consulte a secção “Protocolo 6: Análise de uma execução no PyroMark Q24 MDx”, página 29, e Apêndice A, página 36).



## Fluxo de trabalho do procedimento PyroMark KRAS



## Características do desempenho

### Limite de branco e limite de detecção

O limite de branco (LOB) e o limite de detecção (LOD) foram determinados para várias mutações usando misturas de plasmídeos semelhantes às fornecidas com o kit. Dependendo do tipo de mutação foram usados dois métodos.

- **Mutações que resultam no aparecimento de um pico numa posição que de outra forma estaria em branco:** o LOB e o LOD foram determinados de acordo com as recomendações da norma EP17-A “Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (Protocolo para determinação de limites de detecção e limites quantificadores; directriz aprovada) do NCCLS. Os erros  $\alpha$  e  $\beta$  (falsos positivos e falsos negativos, respectivamente) foram definidos em 5%.
- **A mutação GGT → GTT no codão 12:** esta mutação causa alterações que envolvem picos simples e duplos e não fornece uma resposta linear em níveis de mutação baixos. Esta posição forneceu um LOB que foi consistentemente de 0% unidades ( $n = 72$ ). O sinal mais baixo que indica a presença de uma mutação nesta posição foi definido em 1% unidades,


um valor que está claramente acima do nível basal consistente de 0% unidades. Ao analisar uma amostra contendo 7% unidades de mutação, 95% dos resultados ( $n = 89$ ) produziram um sinal que pode ser considerado positivo ( $\geq 1\%$  unidades). Assim, o LOD para esta mutação foi definido para 7% unidades e todas as amostras que produziram um sinal maior que 1% unidades foram consideradas como positivas para esta mutação.

**Tabela 1. LOB e LOD determinados para mutações específicas**

Mutação	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V42)
<b>Codão 12 (GGT)</b>			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	N.A.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
<b>Codão 13 (GGC)</b>			
GAC	0,3	1,9	532
<b>Codão 61 (CAA), conforme analisado em orientação reversa (TTG)</b>			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

\* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, disponível online no Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

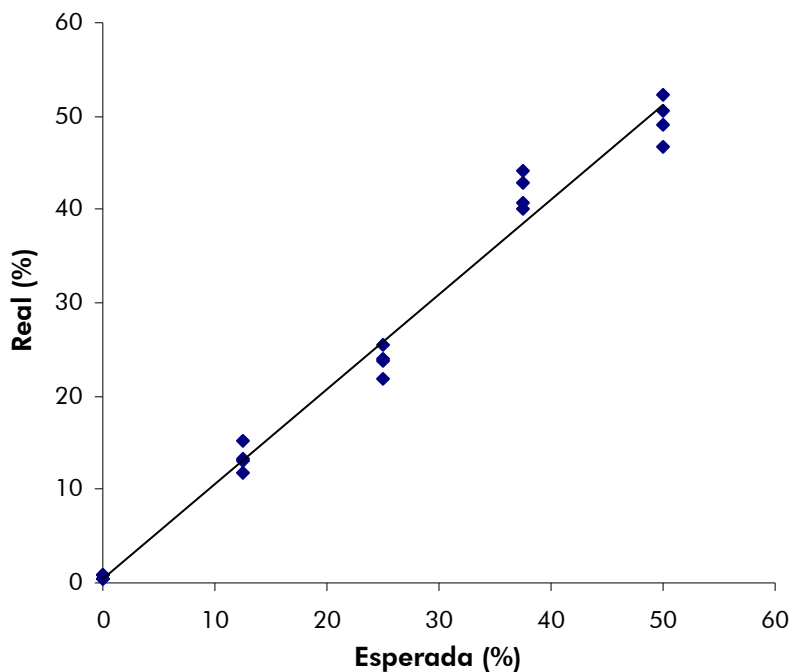
N.A.: não se aplica.

 Estes valores basearam-se em execuções em que o sinal foi superior a 60 RLU, obtidos habitualmente a partir de 10 ng de ADN isolado de tecido fixado em formol e impregnado de parafina. Recomenda-se que o desempenho do método seja confirmado no laboratório.

## Linearidade

A linearidade foi medida de acordo com o documento EP6-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Avaliação da linearidade de procedimentos de medição quantitativos: uma abordagem estatística; norma aprovada) do Clinical and Laboratory Standards Institute.

As sequências normais e mutantes foram misturadas em proporções de modo a fornecer os seguintes níveis de mutação: 0, 12,5, 25, 37,5 e 50%. Foram colocados numa placa quatro replicados das misturas, num padrão aleatório, que foram em seguida analisados. Os resultados para a mutação GGT → TGT no codão 12 foram analisados utilizando o software Analyse-it® v2.04 (Analyse-it Software, Ltd., UK) e são mostrados na figura 2.



**Figura 2. Linearidade da mutação GGT → TGT no codão 12.**

A repetibilidade global foi de 1,64% unidades, tendo os resultados sido lineares numa não linearidade permitida de 3%. Foram obtidos resultados similares com a mutação GGC → GAC no codão 13.

## Imprecisão intermédia

A determinação da linearidade da mutação GGT → TGT no codão 12 foi repetida por 3 operadores em 3 dias diferentes utilizando diferentes combinações de instrumento PyroMark Q24 MDx e PyroMark Gold Q24 Reagents. Os resultados das 3 execuções são mostrados na tabela 2.

**Tabela 2. Imprecisão intermédia**

Esperada	Execução 1		Execução 2		Execução 3		Resumo	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

Todas as unidades são fornecidas sob a forma de % unidades. DP: desvio padrão.

Os valores da imprecisão intermédia (DP) foram, portanto, 0,6–2,0% unidades no intervalo medido de 0–50 %.

### **Sensibilidade e especificidade do diagnóstico**

O PyroMark KRAS Kit foi avaliado num estudo. Foram analisadas 100 amostras prospectivas de cancro colorrectal em relação a mutações nos codões 12 e 13, comparando com o DxS Therascreen®: K-RAS Mutation Kit.

O ADN para testes foi isolado utilizando o EZ1 DNA Tissue Kit e a análise foi realizada com o PyroMark KRAS Kit no PyroMark Q24 MDx e com o Therascreen: K-RAS Mutation Kit no ABI PRISM® 7900HT SDS.

Das 100 amostras analisadas foi possível determinar o estado das mutações em 91 amostras com a análise DxS. Com a análise Pyrosequencing foi possível determinar o estado das mutações dos codões 12 e 13 em 94 amostras.

Excluindo as amostras que falharam em um ou em ambos os kits, verificou-se uma correlação de 100% do PyroMark KRAS Kit, comparado com o Therascreen: K-RAS Mutation Kit. A sensibilidade do diagnóstico com o PyroMark KRAS Kit foi de 100% e a especificidade do diagnóstico também foi de 100% (tabela 3).

**Tabela 3. Resultados das amostras prospectivas de cancro colorrectal analisadas em amostras de tumores em relação aos codões 12 e 13**

		Therascreen: K-RAS Mutation Kit		
		Mutante	ts (tipo selvagem)	Total
PyroMark KRAS Kit	Mutante	33	0	33
	ts (tipo selvagem)	0	57	57

### **Análise do codão 61**

As mesmas 100 amostras foram analisadas para mutações no codão 61 com o PyroMark KRAS Kit. Somente com uma amostra se obteve uma avaliação da qualidade falhada para o ensaio do codão 61. Esta amostra também falhou nos ensaios PyroMark e Therascreen para os codões 12 e 13, o que indica que o ADN era de muito baixa qualidade. A taxa de sucesso mais elevada para o ensaio do codão 61 indica que este ensaio está menos dependente da qualidade do ADN do que os ensaios PyroMark e Therascreen para os codões 12 e 13. Como o ensaio Therascreen não testa mutações no codão 61, não é possível uma comparação directa dos ensaios.

Foram detectadas mutações no codão 61 em 4 das 99 amostras. Três continham mutações frequentes (CAC, CAT, CTA) no codão 61, enquanto a quarta amostra continha mutações no codão 60 (GGT → GGA) e no codão 61 (CAA → AAA).

## Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador

Ao executar tarefas com produtos químicos, usar sempre uma bata laboratorial, luvas descartáveis e óculos protectores adequados. Para mais informações, consulte as material safety data sheets (MSDS) (folhas de dados de segurança dos materiais) adequadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

- Kit de isolamento de ADN (consulte a secção “Isolamento de ADN”, página 15)
- Pipetas (ajustáveis)\*
- Pontas de pipeta estéreis com filtros
- Microcentrífuga de bancada\*
- Reagentes de PCR (o PyroMark KRAS Kit foi validado utilizando o HotStarTaq® Plus Master Mix Kit, ref. 203643, 203645 ou 203646)
- Termociclador\* e tubos de PCR adequados
- Streptavidin Sepharose™ High Performance (GE Healthcare, ref. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 MDx (ref. 9001513)\*†
- PyroMark Q24 MDx Software (ref. 9019063)†
- PyroMark Q24 Plate (ref. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (ref. 979302)†
- PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (ref. 9001515 ou 9001517)\*†
- PyroMark Gold Reagents (ref. 971802)†
- PyroMark Binding Buffer (ref. 979306)†
- PyroMark Denaturation Solution (ref. 979307)†
- PyroMark Wash Buffer, concentrado (ref. 979308)†
- PyroMark Annealing Buffer (ref. 979309)†
- Misturador de placas\* para imobilização nas esferas
- Bloco de aquecimento\*, com capacidade para atingir 80 °C
- Placa ou tiras de PCR de 24 micropoços
- Tira de tampas
- Água de elevada pureza (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou equivalente)
- Etanol (70%)

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

† Marcação CE-IVD de acordo com a Directiva da UE 98/79/CE. Todos os outros produtos listados não têm marcação CE-IVD de acordo com a Directiva da UE 98/79/CE.

## Observações importantes

### Precauções gerais

- ① O utilizador deve sempre prestar atenção às seguintes situações:
  - Utilizar pontas de pipeta estéreis com filtros.
  - Conservar e extrair os materiais positivos (amostras, controlos positivos e amplicões) em separado de todos os outros reagentes e adicioná-los à mistura de reacção em instalações espacialmente separadas.
  - Descongelar totalmente todos os componentes à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar um ensaio.
  - Depois de os componentes estarem descongelados, misturá-los (pipetando repetidamente para cima e para baixo, ou agitando no vórtex) e centrifugá-los por breves instantes.

### Material de amostra

① Todas as amostras têm de ser tratadas como material potencialmente infeccioso.

O material de amostra usado na análise é ADN humano extraído de sangue ou amostras fixadas com formol e impregnadas de parafina.

① Não podem ser usadas amostras de seres humanos sujeitos a tratamento com heparina. Não devem ser usadas amostras de sangue colhidas em tubos que contenham heparina como anticoagulante. A heparina influencia a PCR.

### Isolamento de ADN

Para purificação do ADN a partir dos tipos de amostra humanos indicados para utilização com o PyroMark KRAS Kits são recomendados os kits da QIAGEN mostrados na tabela 4. Proceda à purificação do ADN de acordo com as instruções dos manuais do kit.

**Tabela 4. Kits de purificação de ADN recomendados para utilização com o PyroMark KRAS Kit**

<b>Material de amostra</b>	<b>Kit de isolamento de ácidos nucleicos</b>	<b>Referência (QIAGEN)</b>
Tecido impregnado de parafina	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1® DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sangue	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

\* Seguindo o protocolo de utilização com tecidos impregnados de parafina. O EZ1 DNA Tissue Kit destina-se a ser utilizado juntamente com o EZ1 Advanced (ref. 9001410 ou 9001411) e o EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (ref. 9018298), com o EZ1 Advanced XL (ref. 9001492 ou 9001493) e o EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (ref. 9018700), ou com o BioRobot® EZ1 (ref. 9000705; já não está disponível) e o EZ1 DNA Paraffin Section Card (ref. 9015862).

† Marcação CE-IVD de acordo com a Directiva da UE 98/79/CE.

## Controlos

**i** Neste produto estão incluídos dois controlos positivos. Estes servem como controlos para reacções de PCR e de sequenciação. O wt KRAS Control DNA contém a sequência KRAS normal, e o Mutant KRAS Control DNA contém mutações em todos os 3 codões. Ambos os controlos têm uma troca de base no codão 15 e no codão 59 para os distinguir do ADN genómico. Os controlos podem ser incluídos em separado na análise ou misturados nas proporções preferidas. As sequências dos controlos são mostradas na tabela 5.

**i** Para analisar o Mutant KRAS Control DNA, configure a opção “Sequence to Analyze” (sequência a analisar) para **NGTGRCGTAGGYA**, tendo por alvo a primeira base do codão 12 (consulte o Apêndice A, página 36).

**Tabela 5. Sequências dos controlos**

<b>Controlo</b>	<b>Codão 12</b>	<b>Codão 13</b>	<b>Codão 15</b>	<b>Codão 59</b>	<b>Codão 61</b>
Normal	GGT	GGC	GGT	GTA	CAA
Com mutação	TGT	GAC	GGT	GTA	CAC

**i** Além disso, deve ser sempre incluído um controlo negativo (sem ADN modelo).



# Protocolo 1: Configuração da execução no PyroMark Q24 MDx



## Ponto importante antes de iniciar o ensaio


- Se necessário, o LOB pode ser confirmado através da utilização de uma amostra normal ou com o wt KRAS Control DNA fornecido para gerar uma placa de resultados completa. Para obter mais pormenores, consulte a norma EP17-A “Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline” (Protocolo para determinação de limites de detecção e limites quantificadores; directriz aprovada) do NCCLS.

## O que fazer antes de iniciar o ensaio

- Criar uma configuração do ensaio, conforme descrito no Apêndice A. Tal acção só necessita de ser realizada uma vez, antes de executar o ensaio PyroMark KRAS pela primeira vez (consulte o Apêndice A, página 36).


## Procedimento

1. **Clique em  na barra de ferramentas.**  
É criado um novo ficheiro da execução.
2. **Introduza os parâmetros da execução (consulte a secção “Parâmetros da execução”, mais abaixo).**
3. **Configure a placa adicionado ensaios para ambos os codões 12/13 e para o codão 61 a micropoços correspondentes às amostras a analisar. Recomenda-se como controlos uma amostra negativa (sem ADN) e o wt KRAS Control DNA e Mutant KRAS Control DNA fornecidos.**
4. **Quando a execução estiver configurada e pronta a ser executada no PyroMark Q24 MDx: imprima uma lista dos volumes de mistura enzimática, mistura do substrato e nucleótidos necessários e da configuração da placa. Selecciona “Pre Run Information” (informações pré-execução) no menu “Tools” (ferramentas) e, quando o relatório aparecer, clique em . Feche o ficheiro da execução e copie-o para uma unidade USB (fornecida com o sistema) utilizando o Windows® Explorer.**

 A informação da pré-execução impressa pode ser utilizada como modelo para configuração da amostra (consulte a secção “Protocolo 3: Imobilização dos produtos de PCR nas esferas de Streptavidin Sepharose High Performance”, página 22).

Para executar a placa no PyroMark Q24 MDx, consulte “Protocolo 5: Execução no PyroMark Q24 MDx”, página 27.

## Parâmetros da execução

Run name (Nome da execução):	O nome da execução é dado quando o ficheiro é guardado. A alteração do nome do ficheiro também muda o nome da execução.
Instrument method (Método do instrumento):	Selecione o método do instrumento de acordo com os reagentes e o cartucho que vão ser usados para a execução; consulte as instruções fornecidas com os produtos.
Plate ID (Identificação da placa):	<b>Opcional:</b> introduza a identificação da PyroMark Q24 Plate.
Bar code (Código de barras):	<b>Opcional:</b> introduza um número de código de barras para a placa ou, caso tenha um leitor de códigos de barras ligado ao seu computador, coloque o cursor do rato na caixa de texto "Barcode" (código de barras) (clicando na caixa) e leia o código de barras.
Reagent ID (Identificação do reagente):	<b>Opcional:</b> introduza o número de lote dos PyroMark Gold Q24 Reagents que vão ser usados. O número de lote encontra-se no rótulo do produto.   Recomendamos que introduza a identificação do reagente de modo a que possam ser detectados eventuais problemas inesperados com os reagentes.
Run note (Observação sobre a execução):	<b>Opcional:</b> introduza uma observação sobre o teor ou o objectivo da execução.

## Adicionar ficheiros do ensaio

Para adicionar um ensaio a um micropoço, poderá:

- clicar com o botão direito do rato no micropoço e seleccionar "Load Assay" (Carregar ensaio) do menu de contexto;
- seleccionar o ensaio no pesquisador de atalhos e clicar e arrastar o ensaio para o micropoço.

Os micropoços são codificados por cor consoante o ensaio colocado no micropoço.

## Introduzir identificações de amostras e notas

Para introduzir uma identificação da amostra ou nota, seleccione a célula e introduza o texto.

Para editar uma identificação da amostra ou nota, seleccione a célula (será seleccionado o conteúdo actual) ou faça duplo clique sobre a célula.

## Protocolo 2: PCR utilizando o HotStarTaq Plus Master Mix Kit e o PyroMark KRAS Kit

Este protocolo está indicado para amplificações por PCR de uma região contendo o codão 12 e o codão 13 e uma amplificação por PCR separada de uma região contendo o codão 61 usando o PyroMark KRAS Kit.

### Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- A HotStarTaq Plus DNA Polymerase requer um passo de activação de **5 min a 95 °C** (consulte o Manual de instruções do *HotStarTaq Plus PCR*).
- Prepare todas as misturas de reacção numa área separada da purificação do ADN, adicionando o ADN modelo à PCR, à análise do produto de PCR ou preparação de amostras antes da análise Pyrosequencing.
- Utilize pontas descartáveis com filtros hidrófobos para minimizar a contaminação cruzada.

### O que fazer antes de iniciar o ensaio

- Antes de abrir os tubos com os “primers” de PCR, centrifugue-os brevemente para recuperar o conteúdo que se encontra no fundo dos tubos.
- Ajuste a concentração do ADN da amostra, se necessário, para 0,4–2 ng/μl.

### Procedimento

- 1. Descongele as soluções de “primers” e de ácido nucleico modelo.**  
Misture bem antes de usar.
- 2. Prepare uma mistura de reacção para cada conjunto de “primers” de PCR de acordo com a tabela 6.**

A mistura de reacção contém, tipicamente, todos os componentes necessários para a PCR, com a excepção da amostra.

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

**Tabela 6. Preparação da mistura de reacção para cada mistura de “primers” de PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volume/reacção</b>
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, 2x	12,5 $\mu$ l
PCR Primer KRAS 12/13 <b>ou</b> PCR Primer KRAS 61	1 $\mu$ l
Água de elevada pureza	6,5 $\mu$ l
<b>Volume total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

**3. Misture bem a mistura de reacção e distribua 20  $\mu$ l em cada tubo de PCR.**

Não é necessário manter os tubos de PCR no gelo porque a HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase é inactiva à temperatura ambiente.

**4. Adicione 5  $\mu$ l de ADN modelo (2–10 ng de ADN genómico) aos tubos de PCR individuais (ver tabela 7) e misture bem.**

**i** Deve ser sempre incluído um controlo negativo (sem ADN modelo).

**i** Inclua reacções com o wt KRAS Control DNA e o Mutant KRAS Control DNA como controlos positivos (consulte a secção “Controlos”, página 16).

**Tabela 7. Preparação de PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volume/reacção</b>
Mistura de reacção	20 $\mu$ l
ADN da amostra	5 $\mu$ l
<b>Volume total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

5. Programe o termociclador de acordo com as instruções do fabricante, utilizando as condições descritas na tabela 8.

**Tabela 8. Protocolo de ciclagem otimizado**

			Observações
<b>Passo de ativação inicial:</b>	5 min	95 °C	A HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase é activada por este passo de aquecimento.
<b>Ciclagem em 3 passos:</b>			
Desnaturação	20 s	95 °C	
Hibridação	30 s	53 °C	
Extensão	20 s	72 °C	
Número de ciclos	40		
<b>Extensão final:</b>	5 min	72 °C	

6. Ponha os tubos de PCR no termociclador e inicie o programa de ciclagem.
7. Após a amplificação, prossiga com o "Protocolo 3: Imobilização dos produtos de PCR nas esferas de Streptavidin Sepharose High Performance".

## Protocolo 3: Imobilização dos produtos de PCR nas esferas de Streptavidin Sepharose High Performance

Este protocolo destina-se à imobilização do ADN modelo nas esferas Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) antes da análise no PyroMark Q24 MDx.

### O que fazer antes de iniciar o ensaio

- Deixe todos os reagentes e soluções atingir a temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar um ensaio.

### Procedimento

1. **Agite suavemente o frasco com Streptavidin Sepharose High Performance até a solução estar homogénea.**
2. **Prepare uma mistura principal para imobilização de ADN de acordo com a tabela 9. Prepare um volume 10% superior ao necessário para o número total de reacções a executar.**

**Tabela 9. Mistura principal para imobilização do ADN**

<b>Componente</b>	<b>Volume/amostra</b>
Streptavidin Sepharose High Performance	2 $\mu$ l
PyroMark Binding Buffer	40 $\mu$ l
Água de elevada pureza	28 $\mu$ l
<b>Volume total</b>	<b>70 <math>\mu</math>l</b>

3. **Adicione 70  $\mu$ l da mistura principal aos micropoços de uma placa ou tiras de PCR de 24 micropoços, conforme predefinido na configuração da execução (consulte a secção “Protocolo 1: Configuração da execução no PyroMark Q24 MDx”, página 17).**
4. **Adicione 10  $\mu$ l de produto de PCR biotilado do Protocolo 2 a cada micropoço contendo a mistura principal, conforme predefinido na configuração da execução (consulte a secção “Protocolo 1: Configuração da execução no PyroMark Q24 MDx”, página 17).**

**i** O volume total por micropoço deve ser de 80  $\mu$ l após a adição da mistura principal e do produto de PCR.

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

**i** Certifique-se de que não são possíveis fugas entre os micropoços.

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

ⓘ Durante este passo, prepare a PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation para preparação das amostras, conforme descrito no *Manual do utilizador do PyroMark Q24*.

**7. Prossiga de imediato com o “Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24 MDx”.**

ⓘ As esferas de sefarose sedimentam rapidamente. A captura das esferas tem de ocorrer imediatamente após a agitação.

## Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24 MDx

Este protocolo destina-se à preparação do ADN de cadeia simples e à hibridação do “primer” de sequenciação com o modelo antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24 MDx.

### Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- Antes de abrir os tubos com os “primers” de sequenciação, centrifugue-os brevemente para recuperar o conteúdo que se encontra no fundo dos tubos.
- Adicione os 2 “primers” de sequenciação diferentes no mesmo padrão, conforme predefinido para a placa na configuração da execução (consulte a secção “Protocolo 1: Configuração da execução no PyroMark Q24 MDx”, página 17), dependendo da região da análise (codões 12 e 13, ou codão 61).

### O que fazer antes de iniciar o ensaio

- Coloque o PyroMark Q24 Plate Holder num bloco de aquecimento a 80 °C para ser utilizado no passo 17.

### Procedimento

#### 1. Dilua uma quantidade suficiente de cada “primer” de sequenciação, Seq Primer KRAS 12/13 e Seq Primer KRAS 61 no PyroMark Annealing Buffer, conforme se mostra na tabela 10.

Prepare um volume de “primer” de sequenciação diluído superior ao necessário para o número total de amostras a sequenciar (para o número de amostras + uma extra).

**Tabela 10. Exemplo de diluição dos “primers” de sequenciação**

Componente	Volume/amostra	Volume para 9 + 1 reacções
Seq Primer KRAS 12/13 <b>ou</b> Seq Primer KRAS 61	0,8 µl	8 µl
PyroMark Annealing Buffer	24,2 µl	242 µl
<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>	<b>250 µl</b>



- 2. Adicione 25 µl de “primer” de sequenciação a cada micropoço da PyroMark Q24 Plate de acordo com a configuração da execução (consulte a secção “Protocolo 1: Configuração da execução no PyroMark Q24 MDx”, página 17).**

**i** Mantenha um dos PyroMark Q24 Plate Holder (fornecidos com a PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation) à temperatura ambiente (15–25 °C) e utilize-o como suporte quando preparar e deslocar a placa.

- 3. Coloque a placa de PCR (ou tiras) do Protocolo 3 e a PyroMark Q24 Plate na mesa de trabalho (ver figura 3).**

**i** Certifique-se de que a placa está na mesma orientação que estava na altura em que as amostras foram colocadas.

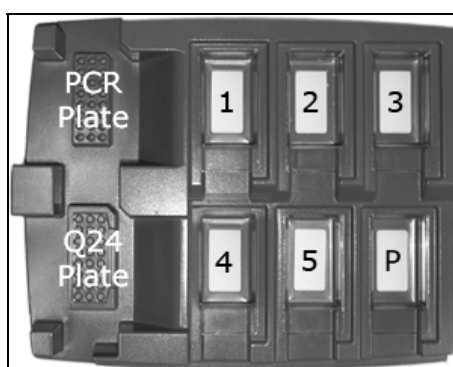


Figura 3. Colocação da placa de PCR (ou tiras) e da PyroMark Q24 Plate na estação de trabalho a vácuo.

- 4. Aplique vácuo à ferramenta abrindo o interruptor de vácuo.**
- 5. Baixe cuidadosamente as sondas com filtro da placa de PCR (ou tiras) para capturar as esferas que contêm o modelo imobilizado. Mantenha as sondas imobilizadas durante 15 s. Tenha cuidado ao pegar na ferramenta.**

**i** As esferas de sefarose sedimentam rapidamente. Se tiver decorrido mais de 1 min desde que a placa (ou as tiras) foi agitada, agite novamente durante 1 min antes de capturar as esferas.
- 6. Transfira a ferramenta para a tina com etanol a 70% (tina 1). Irrigue as sondas com filtro durante 5 s.**
- 7. Transfira a ferramenta para a tina com a solução de desnaturação (tina 2). Irrigue as sondas com filtro durante 5 s.**
- 8. Transfira a ferramenta para a tina com o tampão de lavagem (tina 3). Irrigue as sondas com filtro durante 10 s.**
- 9. Levante a ferramenta para cima e para trás, além de 90° na vertical, durante 5 s para drenar o líquido das sondas com filtro (ver figura 4).**



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

10. Enquanto a ferramenta estiver sobre a PyroMark Q24 Plate, desligue o interruptor de vácuo da ferramenta (Off [desligar]).
11. Solte as esferas na placa contendo os “primers” de sequenciação, agitando suavemente a ferramenta com movimentos laterais. Deixe as sondas com filtro repousar no fundo dos micropoços.
12. Transfira a ferramenta para a tina com a água sem nuclease (tina 4) e agite a ferramenta durante 10 s.
13. Lave as sondas com filtro, baixando-as até à água sem nuclease (tina 5) e aplicando vácuo. Irrigue as sondas com 70 ml de água sem nuclease.
14. Levante a ferramenta para cima e para trás, além de 90° na vertical, durante 5 s para drenar o líquido das sondas com filtro (ver figura 4).
15. Desligue o interruptor de vácuo da ferramenta (Off [desligar]) e coloque a ferramenta na posição de estacionamento (P).
16. Desligue a bomba de vácuo.  

**i** No fim de um dia de trabalho, os resíduos líquidos e as restantes soluções devem ser eliminados e a PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation deve ser inspeccionada para se verificar se tem pó e derrames; consulte o Apêndice B, página 38.
17. Aqueça a PyroMark Q24 Plate com as amostras a 80 °C durante 2 min utilizando o PyroMark Q24 Plate Holder pré-aquecido.
18. Retire a PyroMark Q24 Plate do suporte de placa e deixe as amostras arrefecer até à temperatura ambiente (15–25 °C) durante pelo menos 5 min.
19. Prossiga com o “Protocolo 5: Execução no PyroMark Q24 MDx”.

## Protocolo 5: Execução no PyroMark Q24 MDx

Este protocolo descreve a colocação dos PyroMark Gold Q24 Reagents no PyroMark Q24 Cartridge, assim como iniciar e finalizar uma execução no PyroMark Q24 MDx. Para uma descrição detalhada sobre como configurar uma execução, consulte o *Manual do utilizador do PyroMark Q24*.

### **Ponto importante antes de iniciar o ensaio**


- O relatório "Pre Run Information" (Informações pré-execução), que se encontra no menu "Tools" (Ferramentas) na configuração da execução (consulte "Protocolo 1: Configuração da execução no PyroMark Q24 MDx", página 17), fornece informações sobre o volume de nucleótidos, enzimas e tampão de substrato necessário para um determinado ensaio.

### **Procedimento**

- 1. Coloque o PyroMark Q24 Cartridge com os volumes de nucleótidos, enzimas e tampões de substrato adequados.**
- 2. Abra a porta de cartuchos e insira o cartucho de reagentes cheio com o rótulo virado para fora. Empurre totalmente o cartucho para dentro e, em seguida, para baixo.**
- 3. Certifique-se de que a linha está visível na frente do cartucho e feche a porta.**
- 4. Abra a armação de sustentação da placa e coloque a placa no bloco de aquecimento.**
- 5. Feche a armação de sustentação da placa e a tampa do instrumento.**
- 6. Insira a unidade USB (contendo o ficheiro da execução) na porta USB situada na frente do instrumento.**

 Não retire a unidade USB antes de a execução terminar.

- 7. Seleccione "Run" (Execução) no menu principal (utilizando os botões do ecrã de ▲ e ▼) e prima "OK".**
- 8. Seleccione o ficheiro da execução utilizando os botões do ecrã de ▲ e ▼.**

 Para visualizar o conteúdo de uma pasta, seleccione a pasta e prima "Select" (Seleccionar). Para ir para trás, para a vista anterior, prima "Back" (Retroceder).

- 9. Quando o ficheiro da execução for seleccionado, prima "Select" (Seleccionar) para iniciar a execução.**

10. Quando a execução terminar e o instrumento confirmar que o ficheiro da execução foi guardado na unidade USB, prima "Close" (Fechar).
11. Retire a unidade USB.
12. Abra a tampa do instrumento.
13. Abra a porta do cartucho e remova o cartucho de reagentes, levantando-o e puxando-o para fora.
14. Feche a porta.
15. Abra a armação de sustentação da placa e remova a placa do bloco de aquecimento.
16. Feche a armação de sustentação da placa e a tampa do instrumento.
17. Elimine a placa e limpe o cartucho.
18. Analise a execução de acordo com o "Protocolo 6: Análise de uma execução no PyroMark Q24 MDx".

## Protocolo 6: Análise de uma execução no PyroMark Q24 MDx

Este protocolo descreve a análise de mutações de uma execução KRAS concluída utilizando o PyroMark Q24 MDx Software.

### Procedimento

1. **Insira a unidade USB (contendo o ficheiro processado em execução) na porta USB do computador.**
2. **Desloque o ficheiro da execução da unidade USB para o local desejado no computador usando o Windows Explorer.**
3. **Abra o ficheiro da execução no modo AQ do PyroMark Q24 MDx Software, seleccionando "Open" (Abrir) no menu "File" (Ficheiro) ou fazendo duplo clique no ficheiro (👉) no pesquisador de atalhos.**
4. **Para analisar a execução e obter uma perspectiva geral dos resultados, clique em um dos botões Analyze (Analisar).**



Analisar todos os micropoços.



Analisar o micropoço seleccionado.

Os resultados da análise (frequência de alelos) e a avaliação da qualidade são apresentados por cima da posição variável no traçado de pirograma. Para obter mais detalhes sobre como analisar uma execução, consulte o *Manual do utilizador do PyroMark Q24*.

5. **Para gerar um relatório, seleccione *Full Report* (Relatório completo) em "Reports for AQ runs" (Relatórios das execuções AQ) no menu.**



As mutações mais frequentes no KRAS são encontradas no nucleótido 35 (segunda base do codão 12). Assim, a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) definida na Analysis Setup (Configuração da análise) trata de mutações nesta posição (consultar o Apêndice A, página 36). Se uma amostra tiver uma mutação no nucleótido 34 (primeira base do codão 12), a opção "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) pode ser alterada de modo a analisar também o estado da mutação nesta posição, conforme descrito no Apêndice A.

As frequências actualizadas das mutações no gene KRAS humano nos codões 12/13 e no codão 61 são fornecidas online pelo Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).



Para a obtenção de resultados fiáveis, recomendamos alturas de pico simples superiores a 30 RLU. 30 RLU deve ser definido como "required peak height for passed quality" (altura de pico necessária para aprovação da qualidade) na configuração do ensaio (consulte o Apêndice A e o *Manual do utilizador do PyroMark Q24*).

**i** O relatório dos resultados da análise de AQ deve ser usado para documentação da quantificação de alelos. Os números apresentados no pirograma são arredondados e não mostram a quantificação exacta.

**i** **Reanálise das amostras em que não foi detectada mutação no nucleótido 35 ou com avaliação da qualidade de “Check” (Verificar) ou “Failed” (Falhou).**

Recomendamos veementemente a reanálise de todas as amostras em que não tenha sido detectada mutação no nucleótido 35, bem como amostras que tenham tido avaliação da qualidade de “Check” (Verificar) ou “Failed” (Falhou) com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) tendo por alvo as mutações no nucleótido 34. As avaliações de qualidade “Check” (Verificar) e “Failed” (Falhou) podem indicar um pico de referência numa posição não esperada para uma mutação do nucleótido 35. Um pico em qualquer uma das primeiras 3 distribuições mostra a presença de uma mutação no nucleótido 34.

Para reanalisar e ter como alvo as mutações no nucleótido 34, ir para “Analysis Setup” (Configuração da análise) e alterar a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) de **GNTGRCGTAGGYA** para **NGTGRCGTAGGYA**. Prima o botão “Apply” (Aplicar) e clique em “To All” (Para todos) quando a janela “Apply Analysis Setup” (Aplicar configuração da análise) aparecer.

**i** **Reanálise das amostras para detecção de mutações de baixo nível**

É fortemente recomendada a inclusão de uma amostra normal em cada execução para comparação. Qualquer amostra que demonstre uma frequência de mutações superior à posição correspondente na amostra normal deve ser examinada e comparada com a tabela que mostra o limite de detecção (consulte a tabela 11, página 31). As amostras também podem ser comparadas uma com a outra para revelar frequências de mutações invulgarmente elevadas.

Como orientação, as amostras que tenham uma suspeita de mutação no intervalo do LOD (tabela 11) ao LOD + 3% unidades devem ser reanalisadas em duplicado juntamente com uma amostra normal em duplicado. Se ambos os duplicados tiverem o mesmo resultado que a análise original e forem visivelmente diferentes do controlo normal, então a amostra pode ser considerada como sendo positiva para a mutação. Note-se que uma decisão sobre o tratamento de doentes com cancro não se poderá basear unicamente no estado de mutação do gene KRAS.

**i** Em caso de suspeita de mutação GGT → GTT, um resultado superior a 1% pode ser considerado positivo. Este nível pode variar consideravelmente entre replicados (consulte a secção “Limite de branco e limite de detecção”, página 9).

**Tabela 11. LOB e LOD determinados para mutações específicas**

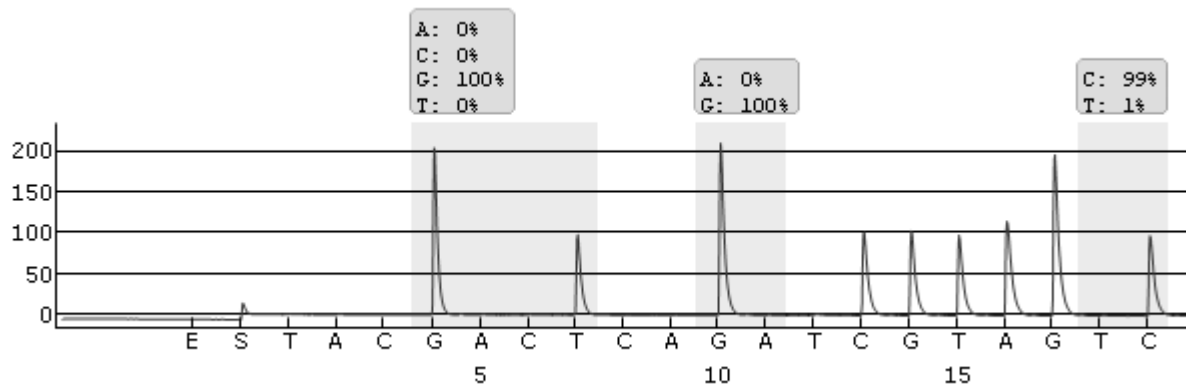
Mutação	LOB (%)	LOD (%)	COSMIC ID* (V42)
<b>Codão 12 (GGT)</b>			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	N.A.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
<b>Codão 13 (GGC)</b>			
GAC	0,3	1,9	532
<b>Codão 61 (CAA), conforme analisado em orientação reversa (TTG)</b>			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

\* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, disponível online no Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

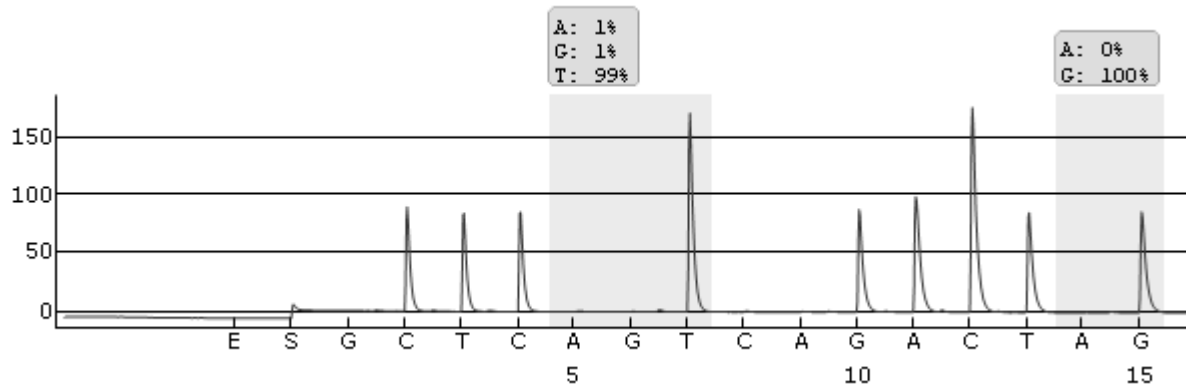
N.A.: não se aplica.

## Resultados representativos

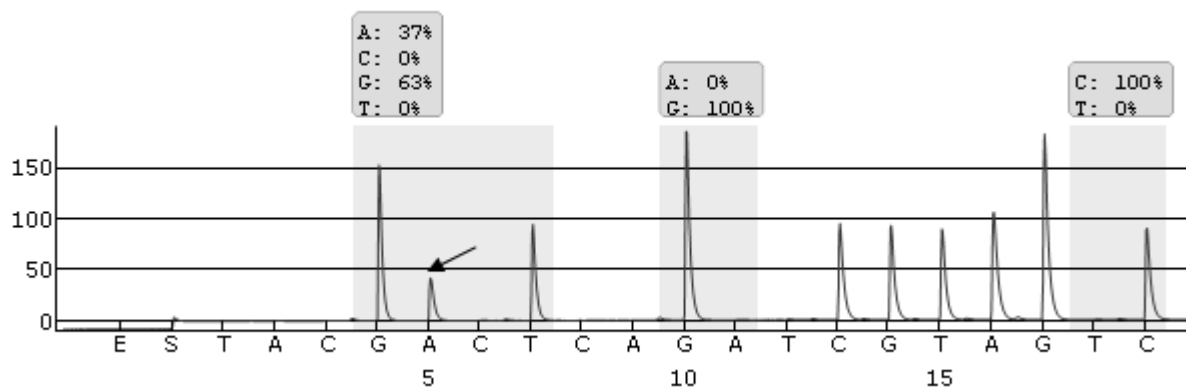
Os resultados representativos do pirograma são mostrados nas figuras 5–10.



**Figura 5.** Traçado de pirograma obtido após análise de uma amostra com um genótipo normal nos codões 12 e 13.

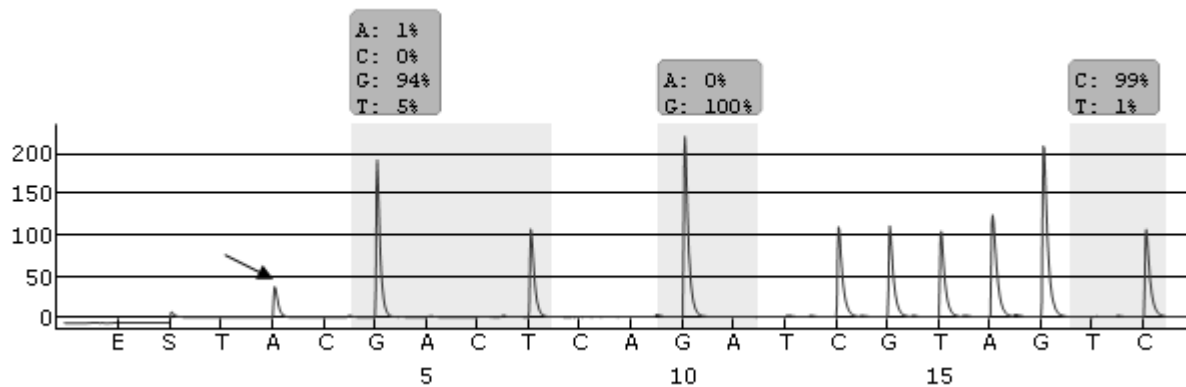


**Figura 6.** Traçado de pirograma obtido após análise de uma amostra com um genótipo normal no codão 61.

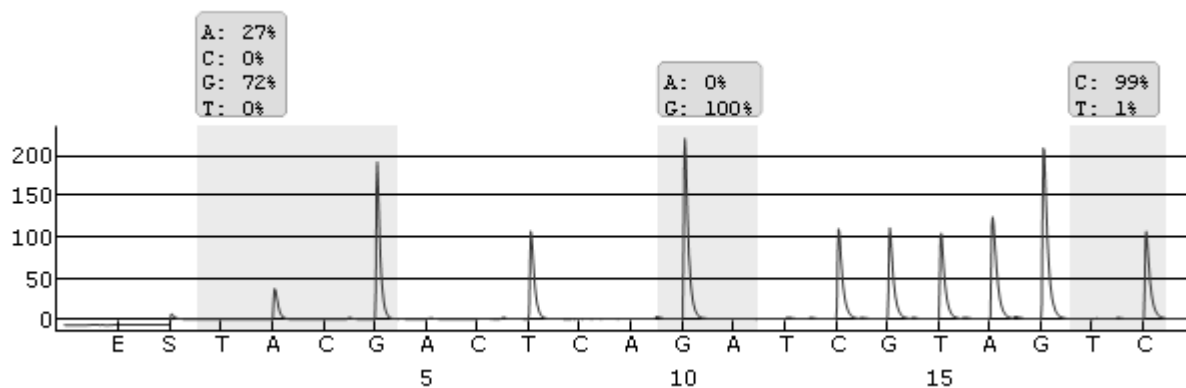


**Figura 7.** Traçado de pirograma obtido após análise de amostras com uma mutação GGT → GAT na base 2 do codão 12 (nucleótido 35, indicado com uma seta).

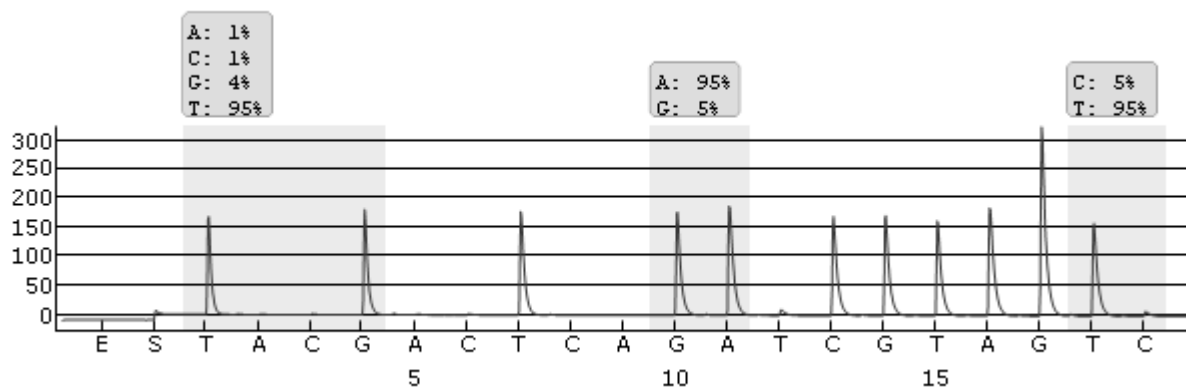




**Figura 8.** Traçado de pirograma obtido após análise de amostras com uma mutação GGT → AGT na base 1 do codão 12 (nucleótido 34, indicado com uma seta) com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) GNTGRCGTAGGYA tendo como alvo a base 2 do codão 12 (nucleótido 35). Uma cor amarela indica que esta sequência é inesperada e tem de ser verificada.



**Figura 9.** Traçado de pirograma e resultado obtido após reanálise da amostra na figura 8. A mutação GGT → AGT foi reanalisada com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) NGTGRCGTAGGYA tendo como alvo a base 1 do codão 12 (nucleótido 34).



**Figura 10.** Traçado de pirograma obtido após análise do Mutant KRAS Control DNA com a “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar) NGTGRCGTAGGYA, tendo por alvo a primeira base do codão 12.

## Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil na resolução de eventuais problemas. Para mais informações, consulte igualmente a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Assistência Técnica:

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Os cientistas dos Serviços Técnicos da QIAGEN estão sempre prontos a responder às dúvidas que possa ter acerca das informações ou dos protocolos constantes deste manual ou das tecnologias de amostragem e ensaio (consulte as informações de contacto na contracapa ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**i** Consulte o *Manual do utilizador do PyroMark Q24* sobre resolução de problemas gerais do instrumento.

### Observações e sugestões

---

#### Sinais no controlo sem modelo (controlo negativo)

- a) Interferência entre micropoços **i** O sinal de um micropoço é detectado num micropoço vizinho. Evite colocar as amostras com intensidades de sinal elevadas próximo dos micropoços de controlo sem modelo.
- b) Contaminação da PCR **i** Utilize pontas de pipeta estéreis com filtros. Conserve e extraia os materiais como amostras, controlos de plasmídeos e produtos da amplificação (“amplicões”) em separado dos reagentes de PCR.

#### Sequência fraca ou inesperada

- Baixa qualidade do ADN genómico **i** A baixa qualidade do ADN genómico pode fazer com que a PCR falhe. Analise as amostras de PCR utilizando uma técnica electroforética (utilizando, por exemplo, o sistema QIAxcel<sup>®</sup> ou a electroforese em gel de agarose).

#### Resultado “Check” (Verificar) ou “failed” (Falhou)

- Mutação rara não definida na configuração do ensaio **i** Ajuste a sequência a analisar na configuração do ensaio (consulte o Apêndice A, página 36) e reanalise a execução.

## Fundo elevado

Incorrecta conservação dos nucleótidos

ⓘ Conserve os nucleótidos a 2–8 °C. A conservação a -20 °C poderá causar um aumento no fundo.

## Nenhum sinal nos controlos positivos (wt KRAS Control DNA e Mutant KRAS Control DNA)

a) Insuficiente mistura enzimática ou de substrato para todos os micropoços

ⓘ Certifique-se de que enche o PyroMark Q24 Cartridge de acordo com as “Pre Run Information” (Informações pré-execução) no menu “Tools” (Ferramentas).

b) Reagentes incorrectamente conservados ou diluídos

ⓘ Prepare os PyroMark Gold Q24 Reagents de acordo com as instruções fornecidas com os reagentes.

## Pico de traçado inesperado na última posição variável

Contaminação com ADN plasmídeo de controlo


ⓘ Os plasmídeos de controlo, o wt KRAS Control DNA e o Mutant KRAS Control DNA, contêm uma diferença na sequência única que pode ser usada para identificar sinais dos controlos (consulte a secção “Controlos”, página 16 e o “Apêndice A: Configuração dos ensaios PyroMark KRAS”, página 36). Utilize pontas de pipeta estéreis com filtros. Conserve e extraia os materiais como amostras, controlos de plasmídeos e produtos da amplificação (“amplicões”) em separado dos reagentes de PCR.

# Apêndice A: Configuração dos ensaios PyroMark KRAS


Antes de executar o ensaio PyroMark KRAS pela primeira vez, tem de configurar o ficheiro do ensaio, conforme descrito abaixo.


## Procedimento

### Codões 12 e 13 do gene KRAS

1. Configure o ensaio para os codões KRAS 12 (posição 2) e 13 (posição 2) do gene KRAS utilizando o PyroMark Q24 MDx Software.
2. Clique em  na barra de ferramentas e seleccione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).
3. Digite a sequência seguinte na "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar).

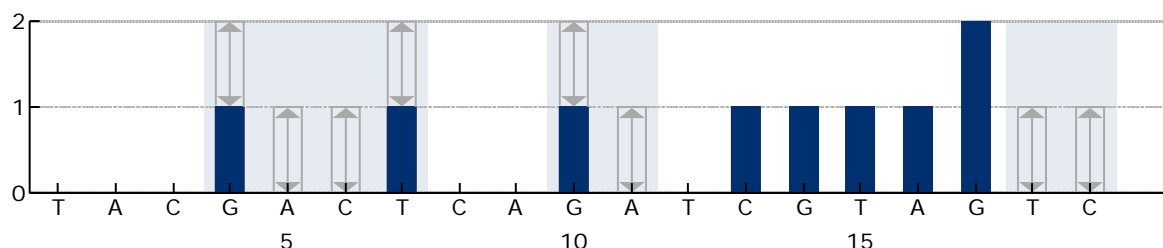
**GNTGRCGTAGGYA**

 As mutações mais frequentes no codão 12 serão detectadas no nucleótido 35 (segunda posição). Se as mutações estiverem presentes no nucleótido 34 (primeira posição), mude a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) para a seguinte sequência:  
**NGTGRCGTAGGYA**

 A posição 3 (Y) variável possibilita a discriminação entre sinais derivados dos controlos do plasmídeo (wt KRAS Control DNA e Mutant KRAS Control DNA) dos sinais do ADN genómico. Enquanto o ADN genómico produzirá um C, os controlos de plasmídeos produzirão um T na posição variável 3.

4. Introduza manualmente a seguinte "Dispensation Order" (Ordem de distribuição):

**TACGACTCAGATCGTAGTC**



**Figura 11. Histograma para os codões 12 (nucleótido 35) e 13 (nucleótido 38) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) GNTGRCGTAGGYA.**

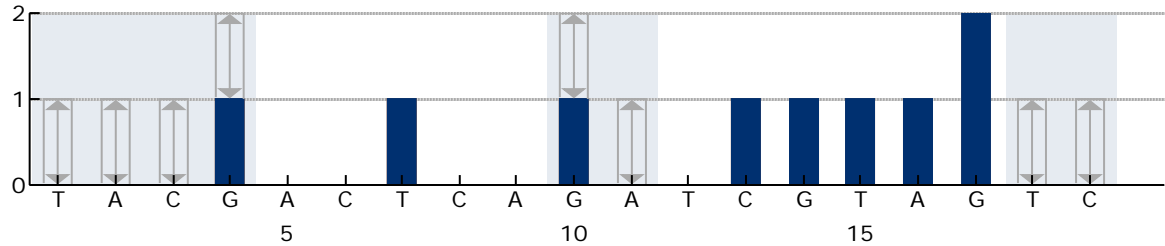


Figura 12. Histograma para os codões 12 (nucleótido 34) e 13 (nucleótido 38) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) NGTGRCGTAGGYA.

5. Clique no separador "Analysis Parameters" (Parâmetros da análise) e aumente "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Limiar da altura do pico — altura do pico necessária para aprovação da qualidade:) para 30.
6. Clique em na barra de ferramentas e guarde o ensaio como **KRAScodon 12+13**.

### Codão 61 do gene KRAS

7. Clique em na barra de ferramentas e selecione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).
8. Digite a sequência seguinte na "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar).

**CTCDTGACCTRC**

A posição 2 (R) variável possibilita a discriminação entre sinais derivados dos controlos do plasmídeo (wt KRAS Control DNA e Mutant KRAS Control DNA) dos sinais do DNA genómico. Enquanto o ADN genómico produzirá um G, os controlos de plasmídeos produzirão um A na posição variável 2.

9. Adicione manualmente a seguinte "Dispensation Order" (Ordem de distribuição): **GCTCAGTCAGACTAG**

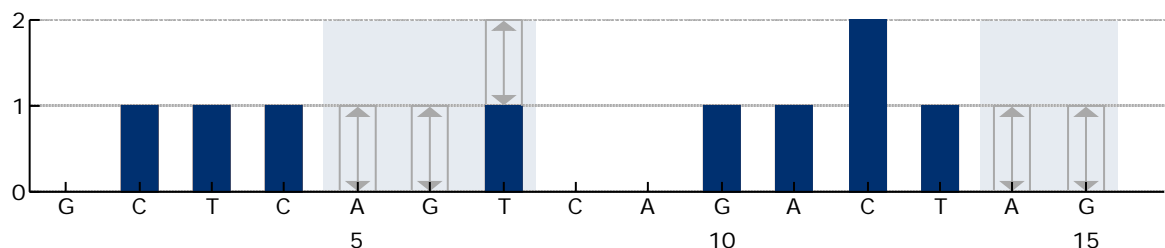



Figura 13. Histograma para o codão 61 (nucleótido 183).

10. Clique no separador "Analysis Parameters" (Parâmetros da análise) e aumente "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Limiar da altura do pico — altura do pico necessária para aprovação da qualidade:) para 30.
11. Clique em na barra de ferramentas e guarde o ensaio como **KRAScodon 61**.

## Apêndice B: Esvaziar o recipiente de resíduos e as finas

<p><b>ADVERTÊNCIA</b></p> 	<p><b>Substâncias químicas perigosas</b></p> <p>A solução de desnaturação utilizada com a estação de trabalho a vácuo contém hidróxido de sódio, um composto irritante para os olhos e a pele.</p> <p>Use sempre óculos de segurança, luvas e bata laboratorial.</p> <p>O responsável (por exemplo, director do laboratório) tem de tomar as precauções necessárias para garantir que o local de trabalho é seguro e que os operadores do instrumento não são expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas (químicas ou biológicas) conforme definido nas material safety data sheets (MSDS) (folhas de dados de segurança dos materiais) ou em documentos da OSHA,* ACGIH,† ou COSHH‡.</p> <p>A ventilação de fumos e a eliminação de resíduos têm de estar de acordo com todas regulamentações e com a legislação nacional, europeia e local relativas a saúde e 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)

Não se esqueça de cumprir os regulamentos ambientais nacionais, estatais e locais relativos à eliminação de resíduos laboratoriais.



### **Ponto importante antes de iniciar o ensaio**

- Este protocolo requer água de elevada pureza (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, [www.millipore.com](http://www.millipore.com), ou equivalente).

### **Procedimento**

- 1. Certifique-se de que não é aplicado vácuo à ferramenta de vácuo. Assegure-se de que o vácuo está desligado (Off) e a bomba de vácuo está desligada.**
- 2. Elimine as soluções que tenham ficado nas finas.**
- 3. Enxagúe as finas com água de elevada pureza ou substitua-as se necessário.**
- 4. Esvazie o recipiente de resíduos.**



A tampa pode ser removida sem desligar o tubo.

- 5. Se a estação de trabalho a vácuo tiver de ser limpa (por exemplo, devido a poeiras ou derrames), siga as instruções do *Manual do utilizador do PyroMark Q24*.**

## **Bibliografia**

A QIAGEN mantém uma grande base de dados online actualizada de publicações científicas em que são utilizados produtos da QIAGEN. As opções de pesquisa completas permitem encontrar os artigos de que necessita, introduzindo uma simples palavra-chave ou especificando a aplicação, a área de investigação, o título, etc.

Para uma lista completa de referências, visite a Base de Dados de Referência da QIAGEN em [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) ou contacte os Serviços Técnicos da QIAGEN ou o distribuidor local.

## Informações sobre encomendas

<b>Produto</b>	<b>Conteúdo</b>	<b>Ref.</b>
PyroMark KRAS Kit (24)	Para 24 reacções no PyroMark Q24 MDx: “primers” de sequenciação, “primers” de PCR, wt KRAS Control DNA, Mutant KRAS Control DNA	971450
PyroMark Q24 MDx	Plataforma de detecção baseada em sequência para Pyrosequencing de 24 amostras em paralelo	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Estação de trabalho a vácuo (220 V) para preparação de 24 amostras em paralelo, do produto de PCR ao modelo de cadeia simples	9001515* 9001517†
PyroMark Q24 MDx Software	Software da aplicação	9019063
<b>Acessórios</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reacção de sequenciação com 24 micropoços	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para distribuição de nucleótidos e reagentes	979302
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Para 5 x 24 amostras: mistura enzimática, mistura de substratos e nucleótidos	971802
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Para ligação de produto de PCR biotinilado às esferas de sefarose	979306
PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Para desnaturação do produto de PCR de cadeia duplo no ADN modelo de cadeia simples	979307
PyroMark Wash Buffer, concentrado (200 ml)	Para lavagem do ADN de cadeia simples	979308
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Para hibridação do “primer” de sequenciação ao produto de PCR de cadeia simples e para a reacção Pyrosequencing	979309

\* Para o resto do mundo (não para o Reino Unido).

† Para o Reino Unido.



<b>Produto</b>	<b>Conteúdo</b>	<b>Ref.</b>
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas com filtro reutilizáveis para PyroMark Vacuum Workstation Q96 e Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Para verificação da instalação do sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para confirmação do desempenho do sistema	979304
<b>Produtos relacionados</b>		
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (250)	Para 250 reacções x 20 µl: 3 x 0,85 ml de HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix contendo 250 unidades de HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase total, 1 x 0,55 ml de concentrado CoralLoad®, 2 x 1,9 ml de água sem RNase	203643
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (1000)	Para 1000 reacções x 20 µl: 12 x 0,85 ml de HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix contendo 1000 unidades de HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase total, 4 x 0,55 ml de concentrado CoralLoad, 8 x 1,9 ml de água sem RNase	203645
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (2500)	Para 2500 reacções x 20 µl: 25 ml de HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix contendo 2500 unidades de HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase total, 5,5 ml de concentrado CoralLoad, 2 x 20 ml de água sem RNase	203646
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparações de ADN: 50 colunas QIAamp MinElute®, proteinase K, tampões e tubos de colheita (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Para 48 preparações: Cartuchos de reagentes (tecidos), pontas com filtro descartáveis, suportes de pontas descartáveis, tubos de amostra (2 ml), tubos de eluição (1,5 ml), tampão G2, proteinase K	953034

<b>Produto</b>	<b>Conteúdo</b>	<b>Ref.</b>
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparações: minicolunas de centrifugação QIAamp, tampões, reagentes, tubos, VacConnectors	61104

Para obter informações de licenciamento actualizadas e renúncias de responsabilidades específicas do produto, consulte o manual do kit QIAGEN respectivo ou o manual do utilizador. Os manuais do kit da QIAGEN e os manuais do utilizador estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados aos Serviços Técnicos da QIAGEN ou ao distribuidor local.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Marcas comerciais: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems Corporation ou filiais); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose™ (GE Healthcare); Therascreen® (DxS Limited); Windows® (Microsoft Corporation).

#### **Acordo de licença limitado**

A utilização deste produto significa a concordância de qualquer comprador ou utilizador do PyroMark KRAS Kit com as seguintes condições:

1. O PyroMark KRAS Kit só pode ser utilizado de acordo com o *Manual do PyroMark KRAS Kit* e com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede nenhuma licença ao abrigo de nenhuma da sua propriedade intelectual para utilizar ou incorporar os componentes incluídos neste kit com quaisquer outros componentes não fornecidos neste kit, excepto conforme descrito no *Manual do PyroMark KRAS Kit* e protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Além das licenças expressamente indicadas, a QIAGEN não faz qualquer garantia de que este kit e/ou respectiva(s) utilização(s) não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os respectivos componentes estão licenciados para uma utilização única e não podem ser reutilizados, renovados ou revendidos.
4. A QIAGEN renuncia especificamente a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, além das expressamente mencionadas.
5. O cliente e o utilizador do kit concordam em não proceder de forma, nem permitir que outros o façam, a poder conduzir ou facilitar quaisquer actos acima proibidos. A QIAGEN pode invocar as proibições deste Acordo de Licença Limitado em qualquer tribunal e recuperará todos os custos de tribunal e de investigação, incluindo despesas com advogados, em qualquer acção para invocar este Acordo de Licença Limitado ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Consulte em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) os termos da licença actualizados.

© 2009 QIAGEN, todos os direitos reservados.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Alemanha** ■ Encomendas 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Técnico 02103-29-12400

**Austrália** ■ Encomendas 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Técnico 1-800-243-066

**Áustria** ■ Encomendas 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Técnico 0800/28-10-11

**Bélgica** ■ Encomendas 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Técnico 0800-79556

**Brasil** ■ Encomendas 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Técnico 0800-557779

**Canadá** ■ Encomendas 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Técnico 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**China** ■ Encomendas 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Técnico 800-988-0325, 800-988-0327

**Coreia do Sul** ■ Encomendas 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Técnico 1544 7145

**Dinamarca** ■ Encomendas 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Técnico 80-885942

**Espanha** ■ Encomendas 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Técnico 91-630-7050

**EUA** ■ Encomendas 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Técnico 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**Finlândia** ■ Encomendas 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Técnico 0800-914413

**França** ■ Encomendas 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Técnico 01-60-920-930 ■ Ofertas 01-60-920-928

**Holanda** ■ Encomendas 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Técnico 0800-0229602

**Hong Kong** ■ Encomendas 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Técnico 800 930 425

**Irlanda** ■ Encomendas 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Técnico 1800 555 061

**Itália** ■ Encomendas 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Técnico 800-787980

**Japão** ■ Telefone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Técnico 03-6890-7300

**Luxemburgo** ■ Encomendas 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Técnico 8002-2067

**México** ■ Encomendas 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Técnico 01-800-7742-639

**Noruega** ■ Encomendas 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Técnico 800-18712

**Reino Unido** ■ Encomendas 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Técnico 01293-422-999

**Singapura** ■ Encomendas 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Técnico 65-67775366

**Suécia** ■ Encomendas 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Técnico 020-798328

**Suíça** ■ Encomendas 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Técnico 055-254-22-12

