

Febrero 2017

Guía de inicio rápido del complemento BRAF Pyro[®]

Para su instalación y uso con instrumentos
PyroMark[®] Q24 y con el software PyroMark
Q24 versión 2.0

Acerca del complemento BRAF Pyro

El paquete del complemento BRAF Pyro contiene lo siguiente:

- *Guía de inicio rápido del complemento BRAF Pyro*
- Dos archivos de instalación
- Informe de referencia para la verificación funcional del complemento BRAF Pyro

Nota: El complemento BRAF Pyro debe utilizarse únicamente con los kits BRAF Pyro específicos, indicados para aplicaciones descritas en los manuales correspondientes del kit BRAF Pyro.

Instalación del complemento BRAF Pyro

Importante: El complemento BRAF Pyro debe instalarse en instrumentos **PyroMark Q24 con el software PyroMark Q24 versión 2.0**.

1. Cierre el software PyroMark Q24 2.0 si está abierto.
2. Abra el archivo *.zip de la instalación y extraiga los archivos.
3. Haga doble clic en el archivo setup.exe.
4. Siga las instrucciones en los cuadros de diálogo que aparecen.
5. Inicie el software PyroMark Q24 2.0. A continuación, aparecerá el informe del complemento BRAF Pyro debajo de "AQ Add On Reports/BRAF" (Informes del complemento AQ/BRAF) en el menú "Reports" (Informes) en modo AQ.
6. Verifique el funcionamiento del complemento (consulte "Verificación del funcionamiento del complemento" más abajo).

Verificación del funcionamiento del complemento BRAF Pyro

Importante: La verificación deberá llevarse a cabo cada vez que se instale nuevo software o se actualice en el ordenador.

En los pasos siguientes se describe cómo verificar que el software funciona correctamente y no se ha visto afectado por los cambios realizados en el ordenador.

1. Abra la serie analítica "BRAF Example" (ejemplo de BRAF) debajo de "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/BRAF" (Accesos directos/Archivos de ejemplo/Análisis PyroMark/BRAF) en el navegador de accesos directos.
2. Realice un análisis "BRAF" para todos los pocillos, tal como se describe a continuación en "Revisión de una serie analítica PyroMark Q24".
3. Compare los resultados con el informe de referencia. Si los resultados son idénticos, queda confirmado el correcto funcionamiento del complemento BRAF.

Revisión de una serie analítica PyroMark Q24

Importante: El complemento informará sobre la mutación (tabla 1) que mejor se ajuste al pirograma observado.

Importante: es posible que algunas de las mutaciones indicadas en el codón 600, así como los codones 469-469, no se distinguen con precisión a niveles de mutación inferiores al 10%.

En los siguientes pasos se describe el análisis de mutaciones de una serie analítica BRAF finalizada utilizando el complemento BRAF Pyro.

1. Introduzca la unidad USB donde haya guardado el archivo de la serie analítica procesado en el puerto USB del ordenador.
2. Copie el archivo de la serie analítica de la unidad USB a la ubicación deseada del ordenador mediante el Explorador de Windows®.
3. Abra el archivo de la serie analítica en el modo AQ del software PyroMark Q24. Para hacerlo, seleccione “Open” (abrir) en el menú “File” (archivo) o haga doble clic en el archivo (✓) desde el navegador de accesos directos.
4. Seleccione “AQ Add On Reports/BRAF” en el menú “Reports” (Figura 1).

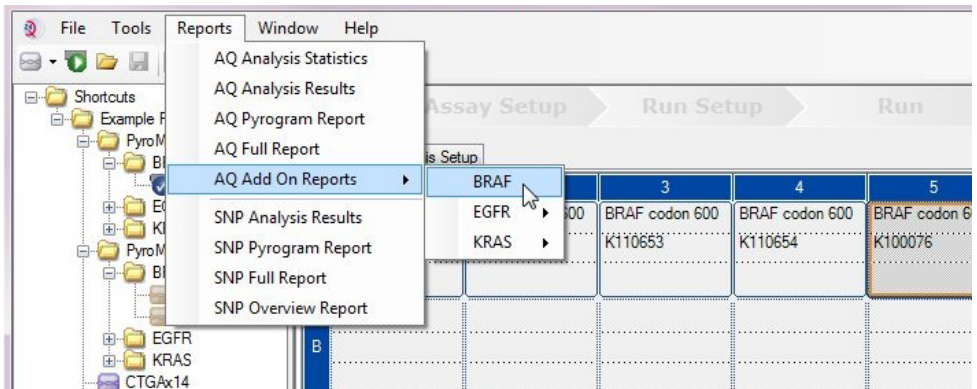


Figura 1. Análisis de mutaciones de una serie analítica BRAF finalizada utilizando el complemento BRAF Pyro.

5. Se analizan automáticamente los pocillos para detectar todas las mutaciones que se indican en la tabla 1. Los resultados para el ensayo tanto del codón 600 de BRAF como para el codón 464–469 de BRAF se presentarán en una tabla general (Figura 2), seguido de los resultados detallados que incluyen los Pyrograms® y la calidad del análisis.

Tabla 1. Mutaciones analizadas por el complemento BRAF Pyro

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LOB (unidades de %)	LOD (unidades de %)	COSMIC ID* (V70)
Codón 600 de BRAF				
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
Codones 464–469 de BRAF				
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
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

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

† Nivel de mutación mínimo de una muestra que da lugar a una medición de frecuencia \geq LOD.

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 2. Ejemplo de resumen de resultados a partir de un análisis de complemento BRAF Pyro.

Interpretación de los resultados y detección de mutaciones de bajo nivel

Se recomienda incluir una muestra nativa en cada serie analítica para realizar la comparación y como control para los niveles de referencia.

Importante: Un valor “Check” (Revisar) o “Failed” (Errónea) para la valoración de la calidad puede ser debido a un patrón de picos no esperado. Esta situación podría indicar una mutación no esperada y que, por lo tanto, no se analiza en el informe de complemento. Estas muestras deberían analizarse manualmente con el software PyroMark Q24 con la consideración de que podrían contener mutaciones no previstas. Consulte el manual del kit BRAF Pyro adecuado para obtener más información.

Importante: El pirograma debe compararse siempre con el histograma, que se muestra en los resultados detallados del informe de complemento y puede visualizarse en el software PyroMark Q24 haciendo clic con el botón derecho en la ventana del pirograma. Es necesario revisar el pirograma para detectar la aparición de picos imprevistos. Si los picos medidos no coinciden con la altura de las barras del histograma y dicha diferencia no se debe a mutaciones raras o imprevistas, el resultado no puede considerarse válido para determinar el estado de la mutación. Se recomienda volver a analizar la muestra.

Importante: Las muestras cuyos resultados indican la posible presencia de una mutación de bajo nivel (frecuencia en el intervalo de unidades de LOD a LOD + 3%) se deben analizar por duplicado con una muestra que contenga ADN de control no metilado. En este caso, aparecerá un aviso. La muestra solo se debe considerar positiva para la mutación si ambos duplicados confirman el resultado del análisis original y son claramente distintos del control normal. De lo contrario, la muestra se considera nativa.

Importante: Para realizar un examen más detenido de las muestras con posibles mutaciones de bajo nivel se recomienda analizar también la muestra manualmente en el software PyroMark Q24, p. ej., para comparar la frecuencia mutacional de la muestra de control (consulte el protocolo correspondiente para obtener más instrucciones). Una frecuencia medida superior al LOB en la muestra de control indica un nivel de fondo superior al habitual en la serie analítica correspondiente, lo que puede afectar la cuantificación de los alelos, especialmente en el caso de niveles mutacionales bajos. En este caso, las posibles mutaciones de bajo nivel notificadas no permiten juzgar el estado mutacional y se recomienda volver a analizar las muestras con una posible mutación de bajo nivel.

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN® correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN Group); Windows® (Microsoft Corporation).
1106188 02/2017 © 2017 QIAGEN. Reservados todos los derechos. PROM-8090-003

Pedidos www.qiagen.com/contact | Asistencia técnica support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com