

Manual do kit *therascreen*[®] UGT1A1 Pyro[®]



Versão 1



Para utilização em diagnóstico in vitro



971540



1061270PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R3



1061270PT



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.

Conteúdo

Utilização prevista	5
Resumo e explicação	5
Princípio do procedimento	6
Controlos	7
Materiais fornecidos	8
Conteúdo do kit	8
Materiais necessários mas não fornecidos	10
Misturadores de placas recomendados	11
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
Protocolos	
■ 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24	15
■ 2: PCR com os reagentes fornecidos com o kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro17	
■ 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de Streptavidin Sepharose High Performance	20
■ 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24	22
■ 5: Execução do PyroMark Q24	26
■ 6: Análise de uma execução PyroMark Q24	29
Interpretação de resultados	30
Guia de resolução de problemas	32
Controlo de qualidade	35
Limitações	35
Características de desempenho	35
Precisão	35
Avaliação de diagnóstico	36

Bibliografia	38
Símbolos	39
Informações de contacto	39
Anexo A: Preparação de ensaios <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	40
Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos	42
Informações para encomendar	44

Utilização prevista

O kit *therascreen* UGT1A1 Pyro é um teste de detecção *in vitro* de ácido nucleico com base em sequências, baseado na tecnologia de piro-sequenciação[®], para genotipagem de variantes dos alelos *28 e *6 do gene humano UGT1A1 no ADN genómico derivado de amostras de tecido humano.

O kit *therascreen* UGT1A1 Pyro destina-se a fornecer aos médicos informações para ajudar na selecção de doentes com maior risco de actividade reduzida da UDP-glucuronosiltransferase. 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* UGT1A1 Pyro é utilizado para genotipagem da variante do alelo *28 (para distinguir entre 6 e 7 repetições TA) e da variante do alelo *6 (para distinguir entre o genótipo G e A) do gene humano UGT1A1. O kit consiste em dois ensaios: um para genotipagem da variante do alelo *28 e o segundo para genotipagem da variante do alelo *6 (imagem 1). 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 genotipagem e avaliação da qualidade da análise.

A variante do alelo *28 é sequenciada na orientação inversa e a variante do alelo *6 na orientação em frente.

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.

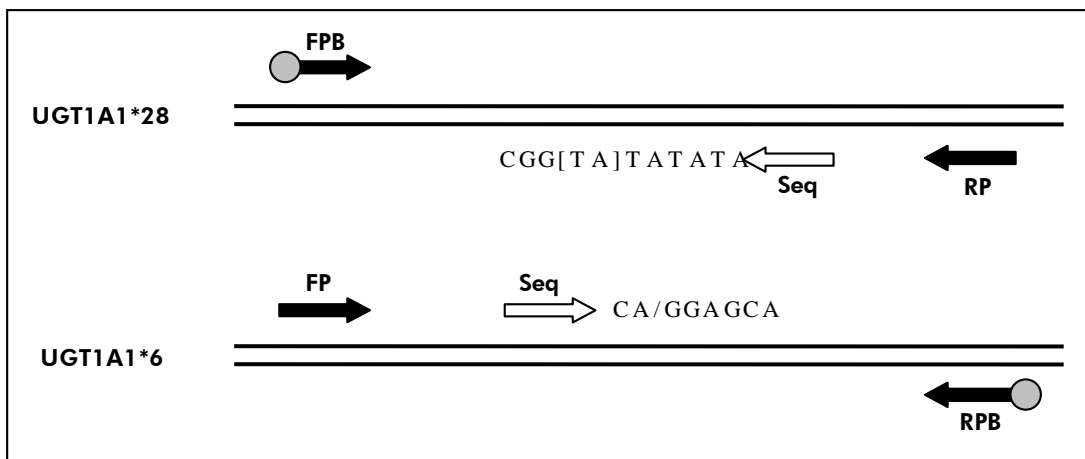


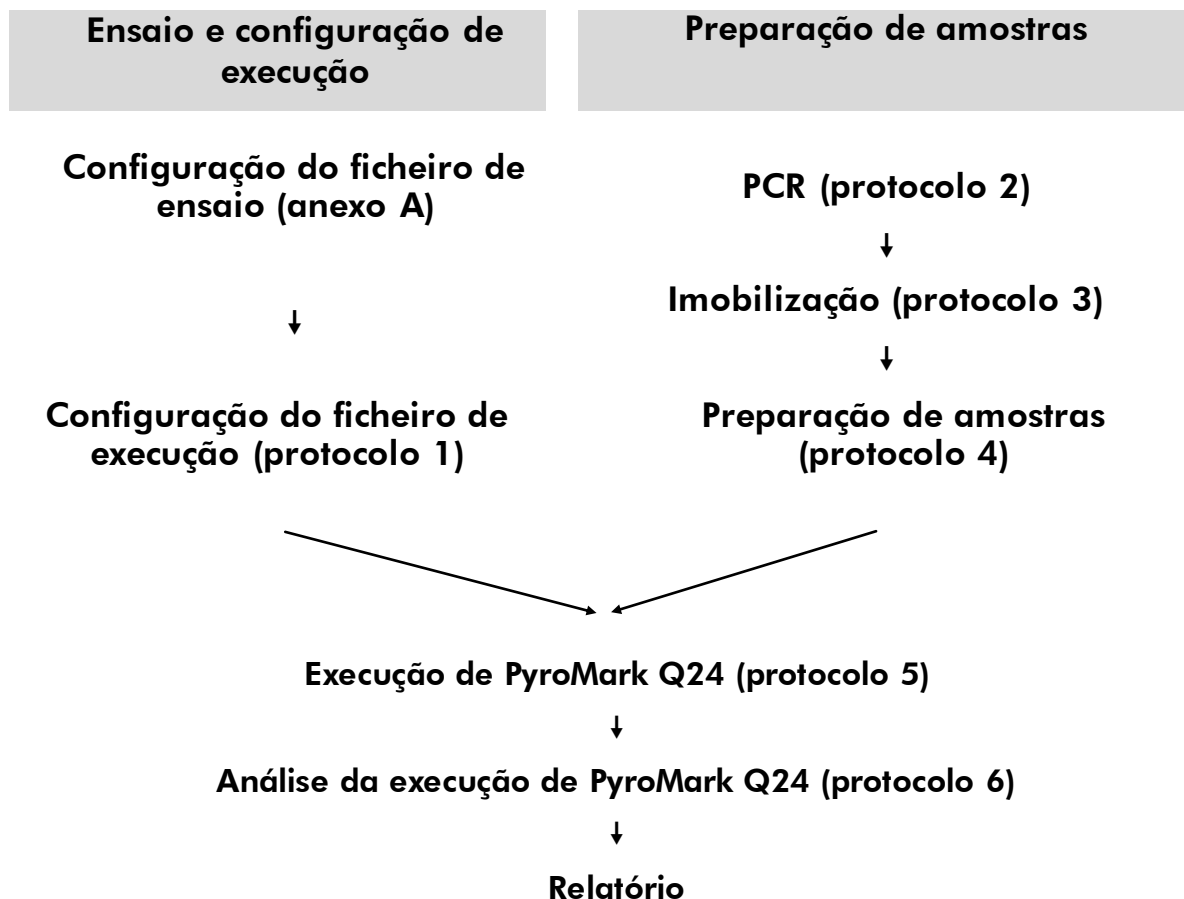
Imagem 1. Ilustração dos ensaios UGT1A1 thetascreen. A sequência indicada é a sequência analisada com nucleótidos polimórficos indicados pelos parêntesis rectos ou pela barra. Parte das repetições TA analisadas com o ensaio *28 UGT1A1 estão cobertas pelo iniciador de sequenciação. **FP, FPB:** Iniciadores de PCR para a frente (B indica biotinição); **RP, RPB:** Iniciadores de PCR de inversão (B indica biotinição); **Seq:** Iniciadores de sequenciação.

Princípio do procedimento

O fluxo de trabalho na página 7 ilustra o procedimento de ensaio. Depois de a PCR utilizar iniciadores que visam as variantes dos alelos *28 e *6, os amplicons são imobilizados em bandas de Streptavidin Sepharose® High Performance. O ADN de cadeia simples é preparado e os respectivos iniciadores de sequenciação são hibridizados para o ADN. Em seguida, as amostras são analisadas no sistema PyroMark Q24, usando ficheiros de configuração do ensaio e um ficheiro de execução.

Nota: O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado em comparação com o *Manual de Utilizador do PyroMark Q24* (consulte "Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24", página 22).

Fluxo de trabalho do procedimento de *therascreen* UGT1A1 Pyro



Controlos

O ADN de controlo humano está incluído no kit como um controlo positivo da PCR e reacções de sequenciação. Este ADN de controlo tem um homozigoto TA6/TA6 e um genótipo G/G quando analisado quanto a variantes dos alelos *28 e *6, respectivamente.

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

Kit *therascreen* UGT1A1 Pyro (caixa 1/2)

Manual do kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	(24)
Ref.^o	971540
Número de reacções	24
Mistura de iniciadores de PCR UGT1A1 *28	24 µl
Mistura de iniciadores de PCR UGT1A1 *6	24 µl
Iniciador de Seq UGT1A1 *28	24 µl
Iniciador de Seq UGT1A1 *6	24 µl
Mistura principal de PCR PyroMark, 2x	850 µl
Concentrado CoralLoad [®] , 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
ADN de controlo humano, 2 ng/µl	100 µl

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

Soluções tampão e reagentes <i>therascreen</i>		
Tampão de ligação PyroMark		10 ml
Tampão de "annealing" PyroMark		10 ml
Solução de desnaturação PyroMark*		250 ml
Tampão de lavagem PyroMark, 10x		25 ml
Mistura de enzimas		1 frasco
Mistura de substrato		1 frasco
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Manual		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, consultar as fichas de dados de segurança (SDS) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

- Kit de isolamento de ADN (consulte “Isolamento de ADN”, 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 9001514 ou 9001513)*†
- Software de PyroMark Q24 (ref.º 9019062 ou 9019063)†
- 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 e placa* para a imobilização de bandas (consulte “Misturadores de placas recomendados”, página 11)
- 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 no quadro 1 são recomendados para utilização com o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro.

Quadro 1. Misturadores de placas recomendados para utilização com o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro

Fabricante	Produto	Ref. ^o
Eppendorf	Thermomixer comfort (dispositivo básico)	5355 000.011
	Termo bloco para placas de microtitulação	5363 000.012
	Placa adaptadora para tubos de PCR de 96 x 0,2 ml para inserir em blocos de placas de microtitulação	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag [®] Teleshake	51410 (115 V=51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V=51110 U)

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico in vitro

Informações de segurança

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online num formato PDF compacto e adequado em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as SDS para cada kit QIAGEN[®] e componente de kit.

As seguintes advertências de precaução e de perigo aplicam-se aos componentes do kit *therascreen* UGT1A1 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

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 (consulte "Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24", página 22) em comparação com o *Manual de Utilizador do PyroMark Q24*.
- Os componentes deste produto são suficientes para executar as 24 reacções em até 5 execuções independentes.
- Utilize pontas de pipeta esterilizadas (com filtros para 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 (ao pipetar repetidamente para cima e para baixo ou ao vibrar com agitação) e centrifugue com brevidade.
- Resultados falhados não são uma base para uma decisão do genótipo.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

O kit *therascreen* UGT1A1 Pyro é transportado em duas caixas. O kit *therascreen* UGT1A1 Pyro (caixa 1/2) é transportado em gelo seco. A mistura principal de PCR PyroMark, o concentrado CoralLoad, o ADN de controlo e todos os iniciadores devem ser armazenados a -30 até -15 °C, após a chegada.

As soluções tampão e os reagentes Pyro (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 a 2–8 °C, após a chegada. Para minimizar a perda de acção, 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 a 2–8 °C. As misturas de enzimas e de substrato reconstituídas podem ser congeladas e armazenadas nos seus frascos entre -30 a -15 °C. Os reagentes congelados não devem ser sujeitos a mais de 6 ciclos de congelamento/descongelamento.

Nota: Os nucleótidos não devem ser congelados.

O kit *therascreen* UGT1A1 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 materiais potencialmente infecciosos.

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

Não se deve utilizar amostras humanas submetidas a tratamento de heparina. Não se deve utilizar as amostras de sangue que tenham sido recolhidas em tubos que continham heparina como anticoagulante. A heparina afecta a PCR.

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 extração de ADN humano de amostras de tumor fixadas em formalina e envolvidas em parafina. No sistema de mini kit QIAamp DSP DNA Blood, o desempenho foi estabelecido através de amostras de sangue de dador saudável, perfurada parcialmente com células de tumor.

Os kits da QIAGEN apresentados no quadro 2 são recomendados para a purificação de ADN dos tipos de amostras humanas indicadas para a utilização com o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro. Efectuar a purificação de ADN de acordo com as instruções dos manuais do kits.

Quadro 2. Kits de purificação de ADN recomendados para utilização com o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro

Material de amostras	Kit de isolamento do ácido nucleico	Ref.^o (QIAGEN)
Sangue	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit*	61104
Tecido envolvido em parafina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48) [†]	953034

* Com símbolo CE-IVD, conforme a directiva europeia 98/79/CE.



[†] 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

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Crie uma configuração de ensaio, como descrito no “Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* UGT1A1 Pyro”, página 40. Isto tem de ser feito apenas uma vez, antes de executar os ensaios *therascreen* UGT1A1 pela primeira vez.

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 a variante do alelo *28 e a variante do alelo *6 aos poços que correspondem às amostras a analisar.**
Nota: Deve ser incluída uma amostra de controlo negativa (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR para pelo menos um ensaio.
Nota: Uma amostra com ADN de controlo metilado pode ser incluída para cada ensaio como um controlo positivo da PCR e reacções de sequenciação (consulte “Controlos”, página 7).
4. **Quando a execução está configurada e pronta a executar no 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), usando o Windows® Explorer.**
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 Streptavidin Sepharose High Performance”, página 20).
Para executar a placa no PyroMark Q24, consulte “Protocolo 5: Execução do PyroMark Q24”, página 26.

Parâmetros de execução

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.
Método do equipamento:	Seleccione o método do equipamento de acordo com o cartucho que será utilizado na execução. Consultar as instruções fornecidas com os produtos.
ID da placa:	Opcional: Introduza a ID da placa PyroMark Q24.
Código de barras:	Opcional: Introduza um número de código de barras da placa ou, se tiver algum leitor de códigos de barras conectado ao seu computador, coloque o cursor do rato na caixa de texto "Barcode" (Código de barras) (ao clicar na caixa) e faça a leitura do código de barras.
ID de reagente:	Opcional: Introduza os números de lote caixa 1 e caixa 2 do kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro a usar. Pode encontrar os números de lotes no rótulo do produto. Nota: Recomenda-se a introdução dos números de lotes para que seja possível detectar quaisquer problemas inesperados com o kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro.
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 com os reagentes fornecidos com o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro

Este protocolo serve para a amplificação de PCR de uma região para genotipagem da variante do alelo *28 e uma amplificação de PCR em separado de uma região para genotipagem da variante do alelo *6, usando o kit *therascreen* UGT1A1 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**.
- Configure 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 preparação de amostras antes da análise da piro-sequenciação.
- Utilize as 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 ADN de amostra para 0,4–2 ng/μl. **Nota:** O ADN de controlo humano incluído no kit é fornecido numa concentração de 2 ng/μl.

Procedimento

1. Descongele todos os componentes necessários.

Misture bem antes da utilização.

2. Prepare uma mistura de reacção para cada iniciador de PCR, definida de acordo com o quadro 3.

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.

Quadro 3. 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
Mistura de iniciadores de PCR UGT1A1, variante do alelo *28 ou mistura de iniciadores de PCR UGT1A1, variante do alelo *6	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 (2–10 ng de ADN genómico) aos tubos de PCR individuais (consultar o quadro 4) e misture cuidadosamente.

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

Nota: Uma amostra com ADN de controlo metilado pode ser incluída para cada ensaio como um controlo positivo da PCR e reacções de sequenciação (consulte “Controlos”, página 7).

Quadro 4. 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, com as condições descritas no quadro 5.

Quadro 5. Protocolo de ciclagem otimizada

			Comentários
Passo de ativação 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 o "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de Streptavidin Sepharose High Performance", página 20.

Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de Streptavidin Sepharose High Performance

Este protocolo serve para a 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

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

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 o quadro 6.**

Prepare um volume 10% superior ao necessário para o número total de reacções a efectuar.

Quadro 6. Mistura principal para a imobilização de ADN

Componente	Volume/amostra (µl)
Estreptavidina Sepharose High Performance	2
Tampão de ligação PyroMark	40
Água (H ₂ O, fornecida)	28
Volume total	70

3. **Adicione 70 µl da mistura principal aos poços de uma placa de PCR de 24 poços (ou tiras) como predefinido na configuração de execução (consulte “Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24”, página 15).**
4. **Adicione 10 µl de produto de PCR biotilado do protocolo 2 a cada poço que contém mistura principal, como predefinido na configuração da execução (consulte “Protocolo 2: PCR com os reagentes fornecidos com o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro”, página 17).**

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

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

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.

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*.

7. Continue imediatamente com o “Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24”, página 22.

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 serve para a preparação de ADN de cadeia simples e para “annealing” 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, como predefinido para a placa na configuração da execução (consulte “Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24”, página 15), dependendo da região da análise (variante do alelo *28 ou variante do alelo *6).
- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado ao *Manual de Utilizador do PyroMark Q24* (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 do Utilizador do PyroMark Q24* 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, adicione água de grande pureza a 25 ml de tampão de lavagem PyroMark 10x para atingir um volume final de 250 ml e obter uma solução de trabalho 1x.

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 UGT1A1 *28 e iniciador de Seq UGT1A1 *6, em tampão de “Annealing” PyroMark, como descrito no quadro 7.**

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).

Quadro 7. Exemplo de diluição dos iniciadores de sequenciação

Componente	Volume/amostra (μl)	Volume para reações 9 + 1 (μl)
Iniciador de Seq UGT1A1 *28 ou iniciador de Seq UGT1A1 *6	0,8	8,0
Tampão de "annealing" PyroMark	24,2	242,0
Volume total	25,0	250,0

- 2. Adicione 25 μ l 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", página 15).**

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 (consulte a imagem 2).**

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



Imagem 2. Colocação da placa de PCR (ou tiras) e da placa PyroMark Q24 na estação de trabalho de vácuo.

4. **Aplique vácuo à ferramenta de vácuo, ao abrir o comutador de vácuo.**
5. **Baixe cuidadosamente as sondas de filtro 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 recolher a ferramenta de vácuo.**

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.

6. **Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 40 ml de etanol a 70% (imagem 2). Enxagúe as sondas de filtro durante 5 segundos.**
7. **Transfira a ferramenta para o depósito que contém 40 ml de solução de desnaturação (imagem 2). 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 (imagem 2). 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 (imagem 3).**



Imagem 3. Ilustração da ferramenta de vácuo levantada acima de 90° na vertical.

10. **Enquanto a ferramenta de vácuo for mantida sobre a placa PyroMark Q24, desligue o comutador 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.**

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 (imagem 2) e agite a ferramenta durante 10 segundos.**
- 13. Lave as sondas de filtro, mergulhando as sondas em água de grande pureza (imagem 2) 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 (imagem 3).**
- 15. Desligue o comutador de vácuo na 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 “Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos”, página 42).
- 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 o “Protocolo 5: Execução do PyroMark Q24”, página 26.**

Protocolo 5: Execução do 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*.

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 (consulte "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", 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. Não misture com agitação forte!**

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 o rótulo virado para si.**
- 5. Carregue o cartucho PyroMark Q24 com os volumes adequados de nucleótidos, enzimas e misturas de substrato de acordo com a imagem 4.**

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

* Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDS) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

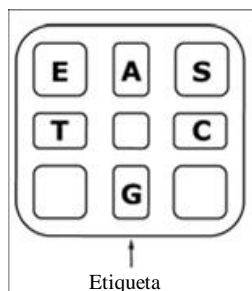


Imagem 4. Ilustração do cartucho PyroMark Q24 visto de cima. As anotações correspondem ao rótulo nos frascos de reagente. Adicione mistura de enzima (E), mistura de substrato (S), e nucleótidos (A, T, C, G) de acordo com a informação do volume indicada no relatório de informações de pré-execução, que se encontra no menu “Tools” (Ferramentas) na configuração de execução.

6. **Abra a porta do compartimento dos cartuchos e introduza o cartucho cheio de reagente, com o rótulo virado 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.**
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 ▼.**
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. **Se a execução estiver concluída 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 o "Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24", página 29.**

Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24

Este protocolo descreve a análise de genotipagem de uma execução de *therascreen* UGT1A1 concluída, usando 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, ao seleccionar "Open" (Abrir) no menu "File" (Ficheiro) ou ao fazer duplo clique sobre o ficheiro (☑) no browser de atalho.
4. 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.

Para mais detalhes sobre como analisar uma execução, consulte o *Manual de Utilizador do PyroMark Q24*.

5. Para criar um relatório, seleccione "SNP Full Report" (Relatório completo SNP) ou "SNP Analysis Results" (Resultados de análise SNP) 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 (consulte o "Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* UGT1A1 Pyro", página 40 e o *Manual de Utilizador do PyroMark Q24*).

Nota: O Pyrogram® deverá ser cuidadosamente 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.

Interpretação de resultados

O ADN de controlo humano incluído pode ser utilizado para comparação de resultados. Este ADN de controlo tem um homocigoto TA6/TA6 e um genótipo G/G quando analisado quanto a variantes dos alelos *28 e *6, respectivamente.

A análise de genotipagem é automaticamente executada pelo software PyroMark Q24 e é fornecido no "SNP Full Report" (Relatório completo SNP) e "SNP Overview Report" (Resultados de análise SNP).

Nota: A avaliação de qualidade e os avisos gerados nos relatórios SNP são relevantes para a análise de genotipagem. As avaliações de qualidade e os avisos adicionais gerados no modo AQ do software PyroMark Q24 podem ser ignorados.

Resultados representativos

Os resultados representativos do pirograma estão apresentados nas imagens 5 a 10.

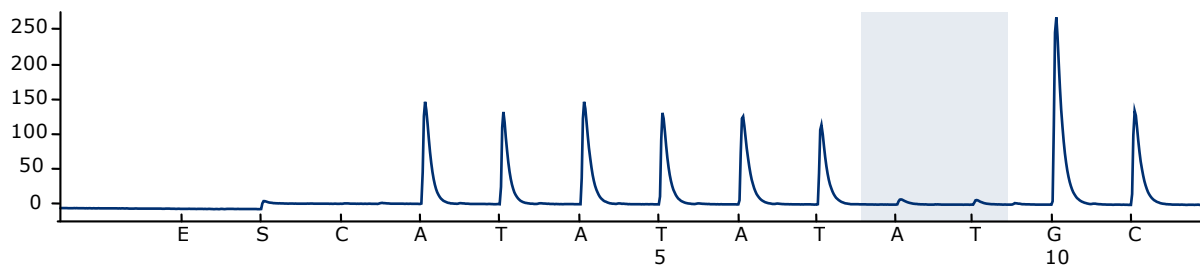


Imagem 5. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com genótipo –/– (TA6/TA6) quando analisada para a variante do alelo *28.

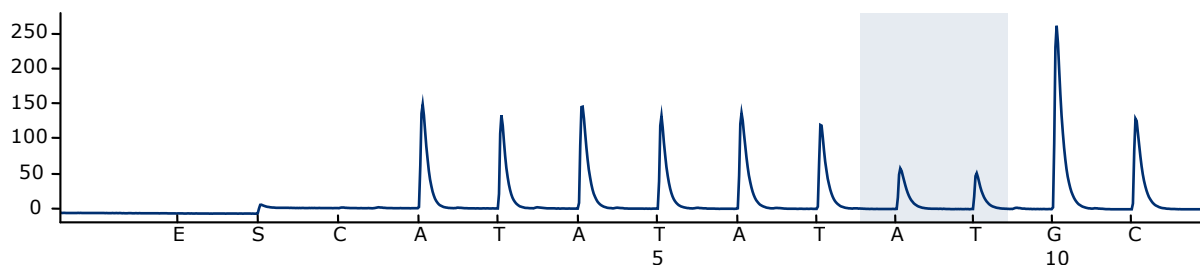


Imagem 6. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com genótipo –/TA (TA6/TA7) quando analisada para a variante do alelo *28.

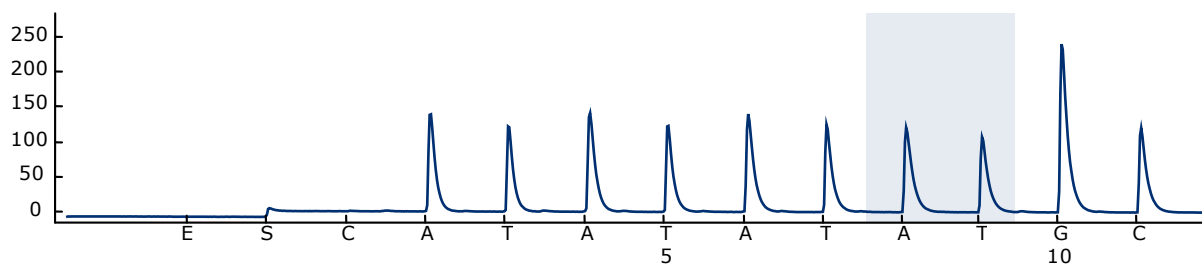


Imagem 7. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com genótipo TA/TA (TA7/TA7) quando analisada para a variante do alelo *28.

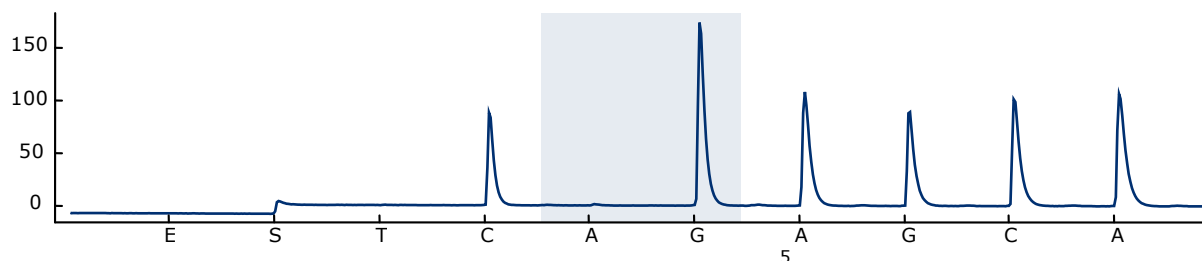


Imagem 8. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com genótipo G/G quando analisada para a variante do alelo *6.

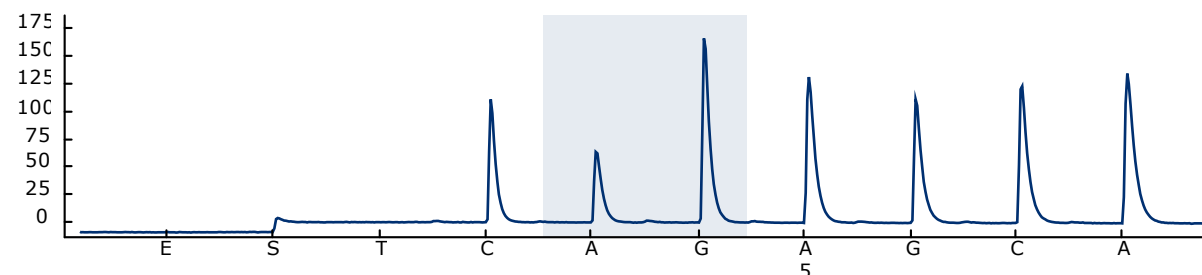


Imagem 9. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com genótipo G/A quando analisada para a variante do alelo *6.

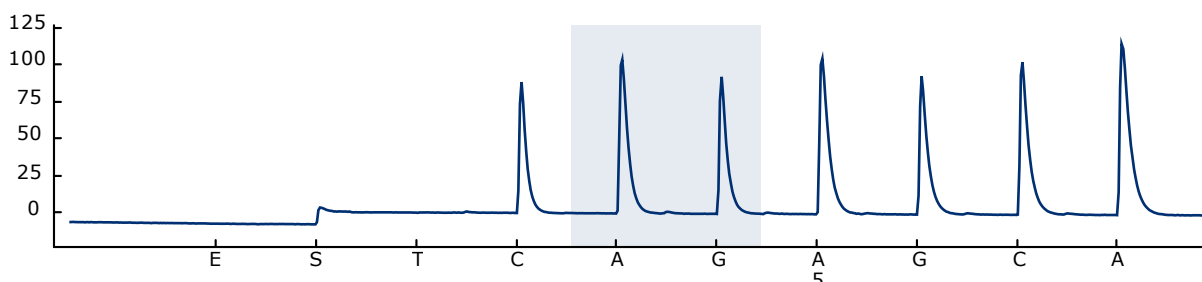


Imagem 10. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com genótipo A/A quando analisada para a variante do alelo *6.

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* 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

- | | |
|---------------------------------|--|
| 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 [®] ou a electroforese em gel de agarose). |
|---------------------------------|--|

Comentários e sugestões

Resultado “Check” (Verificado) ou “Failed” (Falhado) no relatório SNP

- a) Aviso “Uncertain / Failed due to low peak height” (Duvidoso/Falhou devido ao desvio da 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. Tenha cuidado para que a ferramenta de vácuo seja rebaixada lentamente nas amostras e que a geometria da placa da PCR ou tiras utilizadas para a imobilização permita o levantamento completo das amostras. Efectue regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no *Manual do Utilizador do PyroMark Q24* e substitua as sondas de filtro quando for indicado.
- Em caso de uma avaliação de qualidade “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) Aviso “Uncertain / Failed genotype determination” (Duvidoso/Falhou determinação de genótipo)
- Em caso de uma avaliação de qualidade “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.
- Para o ensaio *28 UGT1A1, o aviso pode ser causado pelo deslizamento da polimerase em repetições TA, que podem ser mais acentuados em amostras de tumor FFPE. Certifique-se de que o ADN de alta qualidade é utilizado como modelo (ex., isolado de amostras de sangue) ou aumenta a quantidade de modelo de ADN.

Comentários e sugestões

- c) Variantes dos alelos raros inesperados
Uma avaliação de qualidade "Check" (Verificada) ou "Failed" (Falhada) pode ser causada por um padrão inesperado de picos. Isto poderá indicar uma variante de alelo inesperada, que não é analisada pela "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) fornecida. Estas amostras deverão ser analisadas utilizando a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) alternativa, tendo em conta variantes dos alelos inesperadas.
- d) Aviso de desvio da altura de pico alta durante a distribuição x
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 variantes dos alelos raros, recomenda-se que a amostra seja novamente executada.

Plano de fundo alto

- a) Armazenamento incorrecto de nucleótidos
Armazene os nucleótidos entre 2 e 8 °C.
O armazenamento entre -10 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.

Comentários e sugestões

Sem sinais nos controlos positivos

- | | |
|--|--|
| 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 PyroMark Q24", página 26. |
| 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 piro-sequenciação podem resultar em falta de sinais. Efectue o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no <i>Manual de Utilizador do PyroMark Q24</i> e substitua as sondas de filtro quando indicado. 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* UGT1A1 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

Precisão

Os dados da precisão permitem a determinação da variação total do ensaio quanto à genotipagem correcta das variantes dos alelos *28 e *6. Plasmídeos que exibiam variantes dos alelos foram misturados em proporções (0, 50, 100%) representando os génotipos homocigotos e heterocigotos (*28 TA6/TA6, TA6/TA7 e TA7/TA7; *6 G/G,

G/A e A/A). Cada mistura foi analisada em sete execuções de piro-sequenciação, com três exemplares cada, com variados lotes do kit *therascreen* UGT1A1 Pyro, equipamentos PyroMark Q24, operadores, dias e laboratórios.

A precisão é expressa como a taxa de determinação correcta (ou seja, a proporção de amostras analisadas com um resultado de genotipagem correcto). Os ensaios para a análise de genotipagem das variantes dos alelos *28 e *6 apresentados nos quadros 8 e 9, respectivamente, mostraram uma taxa de determinação correcta de 100% para as amostras analisadas.

Quadro 8. Precisão da genotipagem das variantes dos alelos *28

Genótipo*	Número de amostras	Determinações correctas
Homozigoto TA6/TA6	21	21
Heterozigoto TA6/TA7	21	21
Homozigoto TA7/TA7	20	20

* Representado por misturas de plasmídeos de 0, 50 e 100% com base na medição OD₂₆₀.

Quadro 9. Precisão da genotipagem das variantes dos alelos *6

Genótipo*	Número de amostras	Determinações correctas
Homozigoto G/G	21	21
Heterozigoto G/A	21	21
Homozigoto A/A	21	21

* Representado por misturas de plasmídeos de 0, 50 e 100% com base na medição OD₂₆₀.

Avaliação de diagnóstico

O kit *therascreen* UGT1A1 Pyro foi avaliado em comparação com a sequenciação Sanger. O ADN foi extraído de 100 amostras fixadas em formalina e conservadas em parafina (FFPE) de tumor e analisado quanto a variantes dos alelos *28 e *6.

O ADN foi isolado utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Foi realizada a análise de piro-sequenciação com o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro no PyroMark Q24 e a sequenciação Sanger no ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Das 100 amostras analisadas por sequenciação Sanger, foi possível determinar o genótipo em 95 e 99 amostras de variantes dos alelos *28 e *6, respectivamente.

Com o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro, também foi possível determinar o genótipo em 98 e 99 amostras de variantes dos alelos *28 e *6, respectivamente.

29, 49 e 12 amostras foram registadas por ambos os métodos como tendo um genótipo TA6/TA6, TA6/TA7 e TA7/TA7, respectivamente. Quatro amostras adicionais mostraram um genótipo TA6/TA6 através do kit *therascreen* UGT1A1 Pyro enquanto que os resultados de sequenciação Sanger detectaram um genótipo TA6/TA7 (quadro 10).

Excluindo as amostras que falharam em um ou em ambos os métodos, o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro e a sequenciação Sanger mostraram uma concordância de 96% nos resultados da genotipagem das variantes dos alelos *28 (quadro 10).

Quadro 10. Resultados de genotipagem das variantes dos alelos *28 nas amostras de origem caucasiana

		Sequenciação Sanger				Total
		TA6/ TA6	TA6/ TA7	TA7/ TA7	Desconhe- cido	
Manual do kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	TA6/TA6	29	4	0	2	35
	TA6/TA7	0	49	0	2	51
	TA7/TA7	0	0	12	0	12
	Desconhe- cido	0	1	0	1	2
	Total	29	54	12	5	100

Todas as amostras mostraram um genótipo homozigoto G/G da variante do alelo *6 utilizando a sequenciação Sanger e o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro. Este resultado está em linha com o conhecimento mais recente de que os genótipos A/G e A/A não existem virtualmente nas populações caucasianas. Por isso, o ADN de 26 amostras bucais adicionais colhidas de asiáticos foi isolado utilizando o kit QIAamp DSP DNA Blood Mini no QIAcube® e analisado para variantes dos alelos *6.

Quinze, nove e duas amostras foram registadas por ambos os métodos como contendo genótipo G/G, G/A e A/A, respectivamente (quadro 11).

Excluindo as amostras que falharam em um ou em ambos os métodos, o kit *therascreen* UGT1A1 Pyro e a sequenciação Sanger mostraram uma concordância de 100% nos resultados das variantes dos alelos *6 (quadro 11).

Quadro 11. Resultados de genotipagem das variantes dos alelos *6 nas amostras de origem asiática

		Sequenciação Sanger				Total
		G/G	G/A	A/A	Desconhecido	
Manual do kit <i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro	G/G	15	0	0	0	15
	G/A	0	9	0	0	9
	A/A	0	0	2	0	2
	Desconhecido	0	0	0	0	0
	Total	15	9	2	0	26















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 extraído do sangue ou fixado em formalina e conservado em parafina.

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

 Σ <N>	Contém reagentes suficientes para <N> testes
	Prazo de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Ref. ^ª
	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*

UGT1A1 Pyro

Antes de executar o ensaio *therascreen* UGT1A1 Pyro pela primeira vez, é necessário configurar o ficheiro do ensaio. Prepare o ensaio de variantes dos alelos UGT1A1 utilizando o software PyroMark Q24, conforme descrito em baixo.

Procedimento

UGT1A1 *28

1. Clique em  na barra de ferramentas e seleccione “New AQ Assay” (Novo ensaio AQ).
2. Digite a sequência seguinte em “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar).
ATATAT[AT]GGCA
3. Introduza manualmente o “Dispensation Order” (Pedido de distribuição) seguinte.
CATATATATGC
4. Clique no separador “Analysis Parameters” (Parâmetros de análise) e aumente “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:” (Limiar de altura de pico – altura de pico necessária para qualidade aprovada:) para 30.
5. Clique em  na barra de ferramentas e guarde o ensaio como **UGT1A1 *28**.

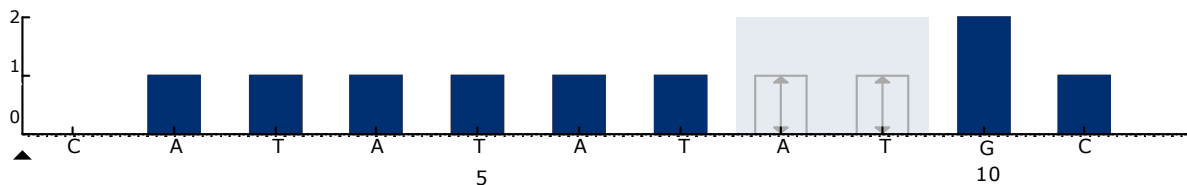



Imagem 11. Histograma de genotipagem da variante do alelo *28 UGT1A1.

UGT1A1 *6

1. Clique em  na barra de ferramentas e seleccione “New AQ Assay” (Novo ensaio AQ).
2. Digite a sequência seguinte em “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar).
CRGAGCAT
3. Adicione manualmente o “Dispensation Order” (Pedido de distribuição) seguinte.
TCAGAGCA
4. Clique no separador “Analysis Parameters” (Parâmetros de análise) e aumente “Peak Height Threshold - Required peak height for Passed

quality:" (Limiar de altura de pico – altura de pico necessária para qualidade aprovada:) para 30.

5. Clique em  na barra de ferramentas e guarde o ensaio como *UGT1A1 *6*.

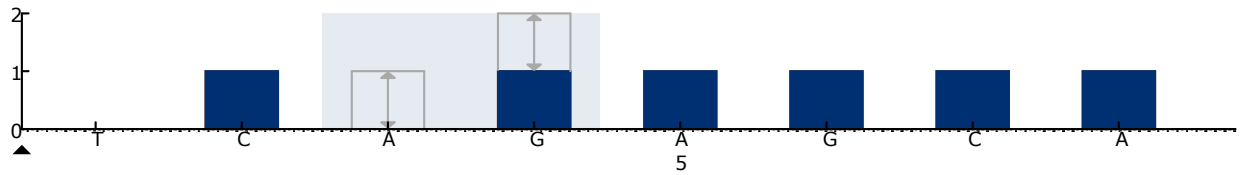



Imagem 12. Histograma de genotipagem da variante do alelo *6 UGT1A1.

Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos

<p>AVISO</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 assegurar que o local de trabalho circundante está em segurança e que os operadores do equipamento não estão expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas (químicas e biológicas), como definido nas fichas de material de segurança (SDS'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.**
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 derramamentos), siga as instruções presentes no *Manual de Utilizador do PyroMark Q24*.

Informações para encomendar

Produto	Conteúdo	Ref.^o
<i>therascreen</i> UGT1A1 Pyro Kit (24)	Para 24 reacções nos sistemas PyroMark Q24: Iniciadores de Seq, iniciadores de PCR, ADN de controlo humano, 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	971540
Acessórios		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reacção de sequenciação de 24 poços	979301
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		
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

Produto	Conteúdo	Ref.^o
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
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparações de ADN: 50 colunas QIAamp MinElute [®] , Proteinase K, Tampões, Tubos de recolha (2 ml)	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
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparações: Colunas de rotação, soluções tampão, reagentes, tubos, conectores de vácuo mini do QIAamp	61104

* Apenas no Reino Unido

† Restantes países

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

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

Contrato de Licença Limitada

A utilização deste produto implica a aceitação por parte de qualquer comprador ou utilizador do kit *therascreen* UGT1A1 Pyro dos seguintes termos:

1. O kit *therascreen* UGT1A1 Pyro pode ser usado unicamente de acordo com o *Manual do kit therascreen UGT1A1 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 qualquer componente não incluído neste kit, salvo descrito em contrário no *Manual do kit therascreen UGT1A1 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 concordam 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 ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

