

Manual de uso del kit *therascreen*[®] GIST RapidScreen Pyro[®]



Versión 1

IVD

Para uso de diagnóstico in vitro



REF 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R2 **MAT** 1075556ES



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

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

QIAGEN define los estándares en los siguientes campos:

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

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para obtener más información, visite www.qiagen.com.

Contenido

Uso previsto	5
Resumen y explicación	5
Principio del procedimiento	7
Controles	8
Materiales suministrados	9
Contenido del kit	9
Materiales requeridos pero no suministrados	10
Advertencias y precauciones	13
Información de seguridad	13
Precauciones generales	13
Almacenamiento y manipulación de reactivos	14
Manipulación y almacenamiento de muestras	14
Procedimiento	15
Aislamiento de ADN	15
Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24	16
Protocolo 2: Ejecución de la PCR con los reactivos para PCR suministrados con el kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	19
Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance	22
Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24	24
Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24	28
Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24	31
Interpretación de los resultados	35
Interpretación de los resultados del análisis y detección de mutaciones de bajo nivel	35
Guía de resolución de problemas	39
Control de calidad	42
Limitaciones	42

Características de rendimiento	43
Límite de blanco y límite de detección	43
Linealidad	45
Precisión	46
Evaluación diagnóstica	47
Referencias	49
Símbolos	50
Información de contacto	51
Apéndice A: Configuración de los ensayos <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	52
Apéndice B: Vaciado del contenedor de residuos y los contenedores	56
Información para pedidos	58

Uso previsto

El kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro es una prueba de detección *in vitro* de secuencias de ácidos nucleicos que utiliza la tecnología Pyrosequencing® que permite la detección cuantitativa de mutaciones en el exón 9 del gen *KIT* humano y en el exón 18 del gen *PDGFRA* humano en ADN genómico obtenido de muestras de tejido humano.

El kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro se ha diseñado para que los médicos dispongan de información que les ayude a gestionar a los pacientes diagnosticados con tumor del estroma gastrointestinal (GIST) que tienen más probabilidades de beneficiarse de fármacos destinados a las vías de señalización, como imatinib. Para uso de diagnóstico *in vitro*.

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

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

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

Este producto no ha sido diseñado para su uso con muestras de tejido pulmonar.

Resumen y explicación

El kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro se utiliza para la medición cuantitativa de mutaciones en el exón 9 de *KIT* y en el exón 18 de *PDGFRA* (consulte la ilustración 1). La detección de mutaciones en el exón 9 de *KIT* permite el uso de la dosis de imatinib apropiada y la detección de mutaciones en el exón 18 de *PDGFRA* ayuda a excluir los genotipos menos sensibles o resistentes (1-3).

Exón 9 de <i>KIT</i>	ATGCTCTGCTTCTGTA CTGCCAGTGGATGTGC AGACACTAAACTCATCT GGGCCACCGTTTGG AAAGCTAGTGGTTCAG AGTTCTATAGATTCTAG TGCATTCAAGCACAATGG CACGGTTGAATG TAAGGCTTACAACGATGT GGGCAAGACTTCTGCC CTAT TTTAACTTTGCATTTAA AGGTAACAA CAAAG
Exón 18 de <i>PDGFRA</i>	TGTGTCCACCGTGATCT GGCTGCTCGCAACGTCCT CCTGGCACAAGGAAAAAT TGTGAAGATC TGTGACTTTGGCCTGGCC AGACATCATGCATGATT CGAACTATGTGTCTGAA AGGCAGT

Ilustración 1. Contexto genómico de las regiones secuenciadas de los genes *KIT* y *PDGFRA* humanos (Ensembl ID ENSG00000157404 y ENSG00000134853). El codón 503 del gen *KIT* y el codón 842 del gen *PDGFRA* están marcados con cuadrados.

Este kit consta de 2 ensayos: uno para la detección de mutaciones en el exón 9 de *KIT* y otro para la detección de mutaciones en el exón 18 de *PDGFRA* (consulte la ilustración 2). Las dos regiones se amplifican por separado mediante la técnica de PCR y posteriormente se procede a la secuenciación de la región definida. Las secuencias colindantes de las posiciones definidas se utilizan como picos de normalización y picos de referencia para la valoración de la cuantificación y calidad del análisis.

Nota: ambos ensayos se realizan con secuenciación directa.

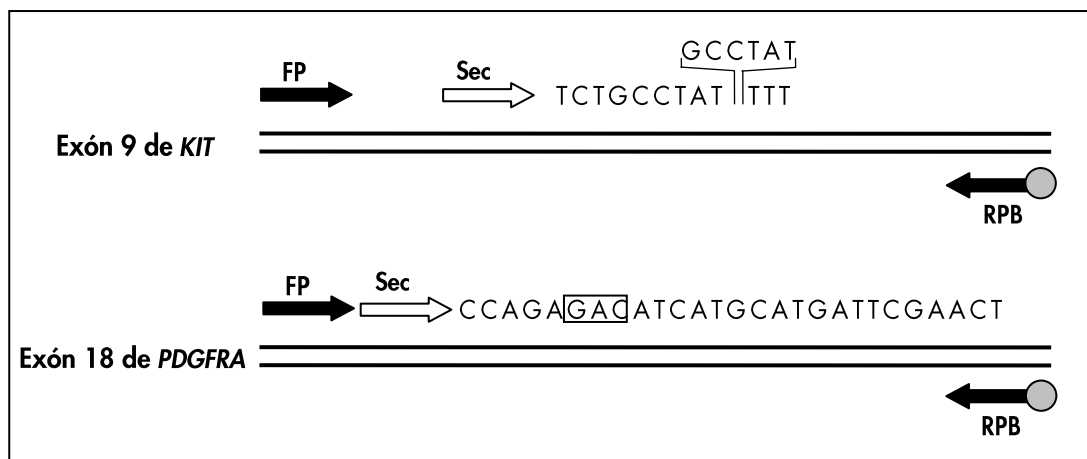


Ilustración 2. Ilustración de los ensayos de *KIT/PDGFRA*. La secuencia indicada corresponde a la secuencia analizada de una muestra nativa. Se indica la posición y la secuencia de la duplicación de 6 bp en el exón 9 de *KIT*. El cuadrado indica el codón 842 del exón 18 de *PDGFRA*. **FP:** primers de PCR directos; **RPB:** primers de PCR inversos (B indica biotilación); **Sec:** primers de secuenciación.

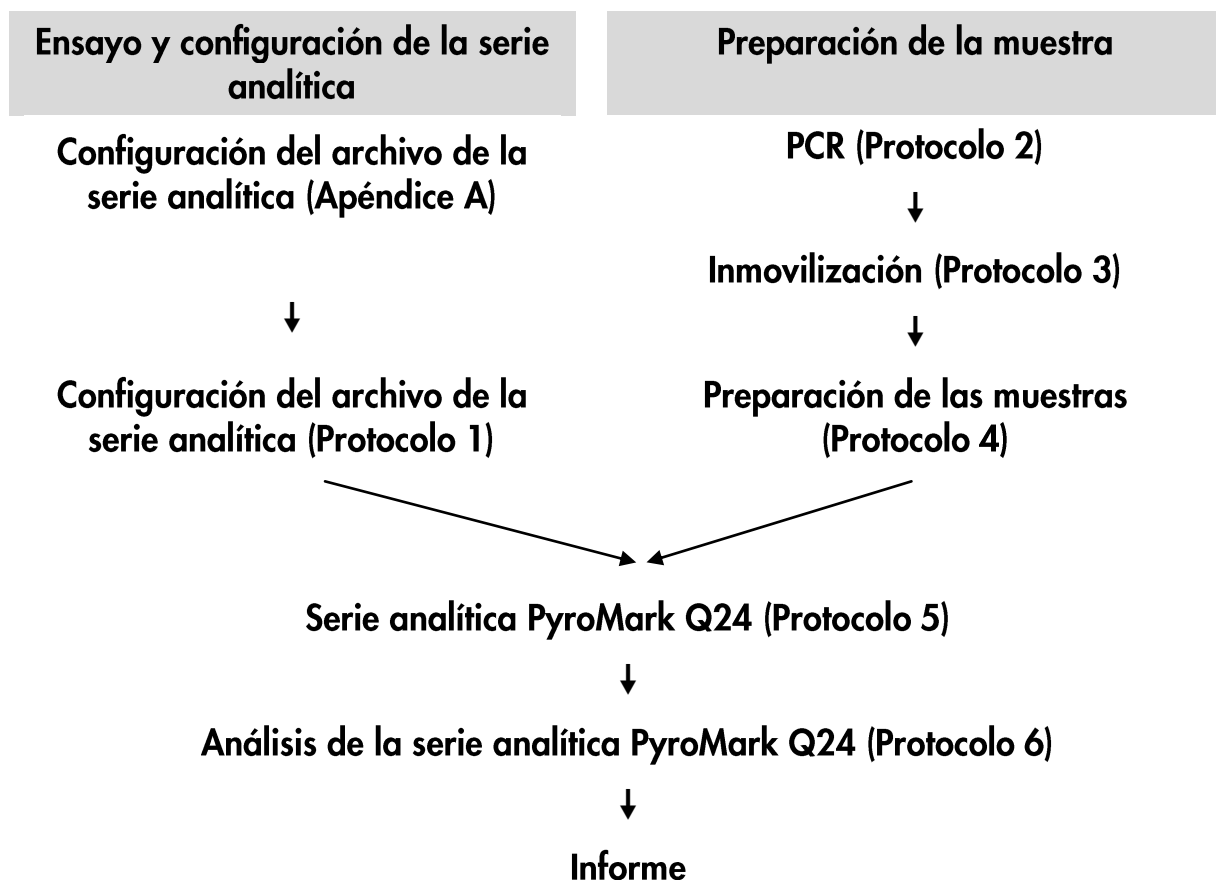
El producto incluye una mezcla de primers de PCR y un primer de secuenciación para cada ensayo. Los primers se suministran en forma de solución. Cada vial contiene 32 µl de cada primer o mezcla de primers.

Principio del procedimiento

El diagrama incluido a continuación ilustra la ejecución del ensayo. Después de realizar la PCR con primers dirigidos al exón 9 de *KIT* y al exón 18 de *PDGFRA*, se inmovilizan los amplicones con las microesferas Streptavidin Sepharose® High Performance. A continuación se prepara el ADN monocatenario y luego se hibridan los primers de secuenciación correspondientes con el ADN. Las muestras se analizan en el sistema PyroMark Q24 utilizando archivos de configuración de ensayo y un archivo para la serie analítica.

Se recomienda utilizar GIST RapidScreen Plug-in Report para analizar la serie analítica. Puede obtener GIST RapidScreen Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección pyro.plugin@qiagen.com. No obstante, también se puede realizar el análisis con la herramienta de análisis integrada en el sistema PyroMark Q24. El valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) se puede ajustar a fin de detectar mutaciones raras una vez finalizada la serie analítica (consulte "Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24", en la página 31 y "Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", en la página 52).

Proceso de trabajo con el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro



Controles

En el kit se incluye ADN de control no metilado como control positivo para las reacciones de PCR y secuenciación. Este ADN de control presenta un genotipo nativo en las regiones sometidas a secuenciación con este kit y es necesario para realizar una correcta interpretación de los resultados e identificación de las mutaciones de bajo nivel (consulte "Interpretación de los resultados", en la página 31). Incluya una muestra con ADN de control no metilado para cada ensayo de cada análisis de pirosecuenciación.

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

Materiales suministrados

Contenido del kit

Kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro (caja 1/2)

<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	(24)
N.º de referencia	971510
Número de reacciones	24
Seq Primer KIT exon 9 (primer de secuenciación del exón 9 de KIT)	32 µl
Seq Primer PDGFRA exon 18 (primer de secuenciación del exón 18 de PDGFRA)	32 µl
PCR Primer Mix KIT exon 9 (mezcla de primers de PCR del exón 9 de KIT)	32 µl
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18 (mezcla de primers de PCR del exón 18 de PDGFRA)	32 µl
PyroMark PCR Master Mix (mezcla maestra PyroMark PCR), 2x	850 µl
CoralLoad® Concentrate (concentrado CoralLoad®), 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA (ADN de control no metilado), 10 ng/µl	100 µl

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

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

* Contiene hidróxido de sodio.

Materiales requeridos pero no suministrados

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

Reactivos

- Kit para el aislamiento de ADN (consulte "Aislamiento de ADN", en la página 15)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n.º de referencia 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Agua ultrapura (Milli-Q® 18,2 M Ω x cm o equivalente)

Nota: en el kit se incluye agua suficiente para la PCR, para la inmovilización del ADN y para disolver la mezcla de enzimas y la de sustratos; se necesita agua ultrapura adicional para la dilución del tampón de lavado PyroMark, 10x.

- Etanol (70%)*

Consumibles

- Puntas de pipeta estériles (con filtros para la preparación de la PCR)
- Placas de PCR de 24 pocillos (consulte "Placas de 24 pocillos recomendadas", en la página 12)
- Lámina adhesiva

Equipo

- Pipetas (ajustables)[†]
- Microcentrífuga de mesa[†]
- Termociclador[†] y tubos para PCR adecuados
- PyroMark Q24 (n.º de referencia 9001513 ó 9001514)^{†‡}
- PyroMark Q24 Software (n.º de referencia 9019063 or 9019062)[†]
- PyroMark Q24 Plate (n.º de referencia 979201)[‡]
- PyroMark Q24 Cartridge (n.º de referencia 979202)[‡]
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (n.º de referencia 9001515 ó 9001517)^{†‡}
- Agitador de placas[†] para la inmovilización de las microesferas (consulte "Mezcladores de placas recomendados", en la página 12)
- Bloque térmico[†] capaz de alcanzar 80 °C

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

[†] Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

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

Placas de 24 pocillos recomendadas

Las placas de 24 pocillos incluidas en la tabla 1 están recomendadas para el uso combinado con el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Tabla 1. Placas de 24 pocillos recomendadas para el uso con el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

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

Mezcladores de placas recomendados

Los mezcladores de placas orbitales incluidos en la tabla 2 están recomendadas para el uso combinado con el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Tabla 2. Mezcladores de placas recomendados para el uso combinado con el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

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

Advertencias y precauciones

Para uso de diagnóstico in vitro

Información de seguridad

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

Las siguientes indicaciones de riesgo y advertencia hacen referencia a los componentes del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro:

PyroMark Denaturation Solution



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

Precauciones generales

El usuario debe proceder siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- Siga todas las instrucciones del manual del usuario para obtener resultados óptimos. No se recomienda la dilución de reactivos distintos a los descritos en este manual. De lo contrario, el rendimiento se verá disminuido.
- Los componentes de este producto son suficientes para realizar 24 reacciones en un máximo de 5 series independientes.
- Utilice puntas de pipeta estériles con filtros (para la configuración de PCR).
- Almacene y extraiga el material positivo (muestras, controles positivos y amplicones) en procedimientos independientes con respecto al resto de reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en una sala separada físicamente.
- Descongele bien todos los componentes a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de iniciar un ensayo.

- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes (mediante pipeteado repetido ascendente y descendente o invirtiendo cada tubo manualmente) y centrifúguelos brevemente.
- Los resultados erróneos no deben tenerse en cuenta para determinar el estado de la mutación.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

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

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

Las mezclas de enzimas y sustratos reconstituidas se mantienen estables como mínimo 10 días si se conservan a una temperatura comprendida entre 2-8 °C. Las mezclas de enzimas y sustratos reconstituidas pueden congelarse y conservarse en sus viales a una temperatura de -15 a -30 °C. Los reactivos congelados no deben someterse a más de 6 ciclos de congelación-descongelación.

Nota: no deben congelarse los nucleótidos.

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

Manipulación y almacenamiento de muestras

Todas las muestras deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

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

No deben utilizarse muestras de sujetos que reciban tratamiento con heparina. No deben utilizarse muestras sanguíneas recogidas en tubos que utilizan heparina como anticoagulante. La heparina afecta el proceso de PCR.

Procedimiento

Aislamiento de ADN

El rendimiento del sistema se ha determinado con el kit EZ1 DNA Tissue y el kit QIAamp® DNA FFPE Tissue para la extracción de ADN humano a partir de muestras tumorales fijadas en formalina e impregnadas en parafina. En el caso del kit QIAamp DSP DNA Blood Mini, el rendimiento se ha determinado utilizando muestras sanguíneas de donantes sanos a las que se han añadido algunas células tumorales.

Los kits QIAGEN de la tabla 3 están validados para la purificación del ADN de los tipos de muestras humanas especificados para su uso con el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Lleve a cabo la purificación del ADN según las instrucciones de los manuales de cada kit.

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

Material de las muestras	Kit de aislamiento de ácidos nucleicos	Número de referencia (QIAGEN)
Tejido impregnado en parafina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sangre	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

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

† Marcado CE-IVD según la Directiva 98/79/CE de la Unión Europea.

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


Cuestiones importantes antes de comenzar


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

Antes de comenzar

- Si todavía no se ha instalado GIST RapidScreen Plug-in Report, cree una configuración de ensayo (consulte "Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", en la página 52). Este paso debe realizarse solamente una vez antes de ejecutar el ensayo *therascreen* GIST RapidScreen Pyro por primera vez. Si se ha instalado GIST RapidScreen Plug-in Report, encontrará las configuraciones de ensayo predefinidas en el navegador de accesos directos del software PyroMark Q24, en la ruta "Example Files/PyroMark Setups/GIST". Puede obtener GIST RapidScreen Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección pyro.plugin@qiagen.com.

Procedimiento

1. Haga clic en  en la barra de herramientas.
Se creará un nuevo archivo de serie analítica.
2. Introduzca los parámetros de la serie (consulte "Parámetros de la serie analítica", en la página 17).
3. Configure la placa. Para ello, añada los ensayos para el exón 9 de KIT y el exón 18 de PDGFRA en los pocillos correspondientes a las muestras que se van a analizar.
Nota: debería incluirse una muestra de control negativo (sin ADN molde) en cada configuración de PCR de como mínimo un ensayo.
Nota: incluya una muestra con ADN de control no metilado para cada ensayo de cada análisis de pirosecuenciación (consulte "Controles", en la página 8).
4. Una vez configurado el ensayo y cuando ya está listo para ser analizado en el sistema PyroMark Q24, imprima una lista de los volúmenes necesarios

para la mezcla de enzimas y de sustratos, de los nucleótidos y la configuración de la placa. Seleccione "Pre Run Information" (Información previa de la serie) en el menú "Tools" (Herramientas) y, cuando aparezca el informe, haga clic en .

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

la información previa de la serie impresa puede servir como molde para la configuración de la muestra (consulte "Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance", en la página 22).

Para analizar la placa en un sistema PyroMark Q24, consulte "Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24", en la página 28.

Parámetros de la serie analítica

"Run name" (Nombre de la serie analítica):	El nombre de la serie analítica se asigna al guardar el archivo. Si se modifica el nombre del archivo se modifica también el de la serie analítica.
"Instrument method" (Método del equipo):	Seleccione el método del equipo en función del cartucho que se vaya a utilizar para la serie analítica; consulte las instrucciones suministradas con los productos.
"Plate ID" (Identificador de la placa):	Opcional: introduzca el identificador de la placa PyroMark Q24.
"Bar code" (Código de barras):	Opcional: introduzca un número de código de barras para la placa o, si tiene un lector de códigos de barras conectado al ordenador, sitúe el cursor del ratón en el cuadro de texto "Barcode" (Código de barras) haciendo clic en el cuadro y escanee el código de barras.
"Kit and Reagent ID" (Identificador del kit y de los reactivos):	Opcional: introduzca el número de lote de la caja 1 y la caja 2 del kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro que se va a utilizar. El número de lote se halla en la etiqueta del producto. Nota: recomendamos introducir ambos números de lote de modo que se pueda realizar el seguimiento de cualquier problema inesperado con el kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro.
"Run note" (Nota de la serie analítica):	Opcional: escriba una nota sobre el contenido o la finalidad de la serie analítica.

Añadir archivos de ensayo

Existen distintos modos de añadir un ensayo a un pocillo:

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

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

Introducir identificadores de muestras y notas

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

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

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

Este protocolo se ha diseñado para amplificaciones mediante PCR de una región que contenga el exón 9 de *KIT* y para la amplificación independiente mediante PCR de una región que contenga el exón 18 de *PDGFRA* utilizando el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Cuestiones importantes antes de comenzar

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

Antes de comenzar

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

Procedimiento

1. Descongele todos los componentes necesarios (consulte la tabla 4).

Mézclelos bien antes de utilizarlos.

2. Prepare una mezcla de reacción para cada conjunto de primers para PCR según los datos de la tabla 4.

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

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

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

Componente	Volumen/Reacción
Mezcla maestra PyroMark PCR, 2x	12,5 µl
Concentrado CoralLoad, 10x	2,5 µl
Primer para PCR del exón 9 de KIT o Primer para PCR del exón 18 de PDGFRA	1 µl
Agua (H ₂ O, suministrada)	4 µl
Volumen total	20 µl

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

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

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

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

Nota: incluya una muestra con ADN de control no metilado para cada ensayo de cada análisis de pirosecuenciación (consulte "Controles", en la página 8).

Tabla 5. Preparación de la PCR

Componente	Volumen/Reacción
Mezcla de reacción	20 µl
ADN de muestra	5 µl
Volumen total	25 µl

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

Tabla 6. Protocolo de ciclado optimizado

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

6. Introduzca los tubos de PCR en el termociclador e inicie el programa de ciclado.
7. Una vez terminada la amplificación, proceda con "Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance", en la página 22.

Las muestras de PCR se pueden almacenar a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C durante un máximo de 3 días.

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

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

Antes de comenzar

- Los reactivos y las soluciones deben estar a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de empezar.
- Encienda el sistema PyroMark Q24 al menos 30 minutos antes de iniciar una serie analítica. El botón de encendido se halla en la parte posterior del equipo.
- Coloque un soporte para placas PyroMark Q24 en un bloque térmico precalentado a 80 °C. Deje un segundo soporte para placas PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15-25 °C).
- El tampón de lavado PyroMark se suministra como concentrado 10x. Antes de utilizar el concentrado por primera vez, dilúyalo con solución de trabajo al 1x añadiendo 225 ml de agua ultrapura en 25 ml de tampón de lavado PyroMark 10x (volumen final de 250 ml).

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

- Prepare la estación de vacío PyroMark Q24 para llevar a cabo la preparación de las muestras tal y como se describe en el Manual de usuario de PyroMark Q24 (PyroMark Q24 User Manual).

Procedimiento

1. **Agite con suavidad la botella de Streptavidin Sepharose High Performance hasta que se forme una solución homogénea.**
2. **Prepare una mezcla maestra para la inmovilización del ADN según los datos de la tabla 7.**

Prepare un volumen superior al necesario para el número total de reacciones que se vayan a realizar (para el número de reacciones + una adicional).

Tabla 7. Mezcla maestra para inmovilización de ADN

Componente	Volumen/Muestra
Tampón de unión PyroMark	40 μ l
Streptavidin Sepharose High Performance	1 μ l
Agua (H ₂ O, suministrada)	29 μ l
Volumen total	70 μl

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

- 3. Añada 70 μ l de mezcla maestra a los pocillos de la placa de PCR de 24 pocillos, según se haya definido en la configuración de la serie analítica (consulte "Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", en la página 16).**

Las microesferas Sepharose tienen un proceso de sedimentación rápido. Asegúrese de que la mezcla maestra sea homogénea mezclándola frecuentemente con una pipeta o mediante vórtex manual. No gire hacia abajo la mezcla maestra.

- 4. Añada 10 μ l de producto de PCR biotinilado del Protocolo 2 a cada pocillo que contenga mezcla maestra, según se haya definido en la configuración del ensayo (consulte "Protocolo 2: Ejecución de la PCR con los reactivos para PCR suministrados con el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", en la página 19).**

el volumen total por pocillo debería ser de 80 μ l tras la adición de la mezcla maestra y el producto de PCR.

- 5. Cierre herméticamente la placa de PCR mediante lámina adhesiva.**

asegúrese de que no pueda haber fugas entre pocillos.

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

Durante este paso, proceda inmediatamente con "Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24", en la página 24.

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

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

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos con primers de secuenciación, centrifúguelos brevemente para depositar el contenido en el fondo de los tubos.
- Añada los 2 primers de secuenciación distintos al mismo patrón tal como se ha definido previamente para la placa durante la configuración del ensayo (consulte "Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", en la página 16), según la región que se vaya a analizar (exón 9 de *KIT* o exón 18 de *PDGFRA*).
- No acorte el tiempo de enfriamiento de las muestras después de calentarlas a 80 °C.
- Realice regularmente la prueba de funcionamiento de las sondas de filtros tal como se describe en *PyroMark Q24 User Manual* (Manual de usuario de PyroMark Q24) y sustitúyalas según se indique.

Procedimiento

- 1. Diluya una cantidad suficiente de cada primer de secuenciación, primer de secuenciación del exón 9 de KIT y primer de secuenciación del exón 18 de PDGFRA, en el tampón de hibridación PyroMark como se muestra en la tabla 8.**

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

No diluya ni almacene más primer de secuenciación.

Tabla 8. Ejemplo de dilución para primers de secuenciación

Componente	Volumen/Muestra	Volumen para 9 + 1 reacciones
Tampón de hibridación PyroMark	24,2 μ l	242 μ l
Primer de secuenciación del exón 9 de KIT o bien	0,8 μ l	8 μ l
Primer de secuenciación del exón 18 de PDGFRA		
Volumen total	25 μl	250 μl

- 2. Añada 25 μ l del primer de secuenciación diluido a cada pocillo de la placa PyroMark Q24 de acuerdo con la configuración de la serie analítica (consulte "Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", en la página 16).**

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

- 3. Encienda la bomba de vacío de la estación de vacío PyroMark Q24.**
- 4. Coloque la placa de PCR del Protocolo 3 y la placa PyroMark Q24 en la estación de vacío (ilustración 3).**

Inspeccione la placa de PCR y asegúrese de que las microesferas Sepharose están en la solución. Asegúrese de cargar la placa de PCR con la misma orientación en la que se han cargado las muestras.



Ilustración 3. Colocación de la placa de PCR y de la placa PyroMark Q24 en la estación de vacío.

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

Las microesferas Sepharose tienen un proceso de sedimentación rápido. La captura de las microesferas debe realizarse inmediatamente después de la agitación. Si transcurre más de 1 minuto desde la agitación de la placa, vuelva a agitarla durante 1 minuto antes de capturar las microesferas.

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

7. **Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 40 ml de etanol al 70% (contenedor 1 en la ilustración 3). Aclare las sondas de filtros durante 5 segundos.**
8. **Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 40 ml de solución de desnaturalización (contenedor 2 en la ilustración 3). Aclare las sondas de filtros durante 5 segundos.**
9. **Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 50 ml de tampón de lavado (contenedor 3 en la ilustración 3). Aclare las sondas de filtros durante 10 segundos.**
10. **Suba la herramienta de vacío e inclínela más de 90° hacia atrás, durante 5 segundos, para drenar el líquido de las sondas de filtros (ilustración 4).**



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

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

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

Al finalizar el día de trabajo, deben desecharse los residuos líquidos y las soluciones restantes y debe revisarse la estación de vacío PyroMark Q24 para comprobar que no haya polvo ni líquido derramado. Consulte "Apéndice B: Vaciado del contenedor de residuos y los contenedores", en la página 56.
- 18. Caliente la placa PyroMark Q24 con las muestras a 80 °C durante 2 minutos mediante el soporte para placas precalentado PyroMark Q24.**
- 19. Retire la placa PyroMark Q24 del soporte para placas calientes y colóquela en el segundo soporte para placas PyroMark Q24 que había dejado a temperatura ambiente (15-25 °C) para permitir que las muestras se enfríen a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.**
- 20. Proceda con "Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24", en la página 28.**

Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24

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

Cuestiones importantes antes de comenzar

- El informe "Pre Run information" (Información previa de la serie), que encontrará en el menú "Tools" (Herramientas) durante la configuración de la serie (consulte "Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", en la página 16), incluye información sobre el volumen de los nucleótidos, las enzimas y los tampones de sustratos necesarios para cada serie.
- Utilice puntas desechables sin filtros hidrofóbicos para cargar el cartucho y permitir el correcto funcionamiento del mismo.

Procedimiento

1. **Disuelva cada una de las mezclas de enzimas y sustratos congeladas y secadas en 620 µl de agua (H₂O, suministrada).**
2. **Agite suavemente el vial para mezclar bien el contenido.**

¡No lo agite mediante vórtice!

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

3. **Espere a que los reactivos y el cartucho PyroMark Q24 alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C).**
4. **Coloque el cartucho PyroMark Q24 con la etiqueta mirando hacia usted.**
5. **Cargue el cartucho PyroMark Q24 con los volúmenes adecuados de nucleótidos, enzimas y mezclas de sustratos de acuerdo con los datos de la ilustración 5.**

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

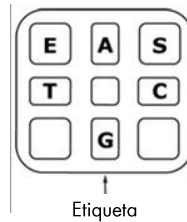


Ilustración 5. Ilustración de la vista superior del cartucho PyroMark Q24. Las anotaciones corresponden a la etiqueta de los viales de reactivos. Añada el volumen de mezcla de enzimas (**E**), mezcla de sustratos (**S**) y nucleótidos (**A, T, C, G**) que se indica en la información sobre volúmenes del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

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

- 21. Deseche la placa y limpie el cartucho siguiendo las instrucciones de la hoja del producto suministradas con el cartucho.**
- 22. Revise la serie analítica según las indicaciones de “Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24”, en la página 31.**

Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24

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

Procedimiento

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

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

Nota: no se pueden analizar dos mutaciones complejas en el exón 18 de *PDGFRA* (2526_2538>G y 2524_2526 GAC>TAT) mediante el análisis AQ del software PyroMark Q24. Se recomienda utilizar GIST RapidScreen Plug-in Report para el análisis de las mutaciones complejas del exón 18 de *PDGFRA*.

5. Si utiliza GIST RapidScreen Plug-in Report:
Para generar un informe, seleccione "AQ Add On Reports/GIST" (Añadir AQ en informes/GIST) en el menú "Reports" (Informes) (consulte la ilustración 6).

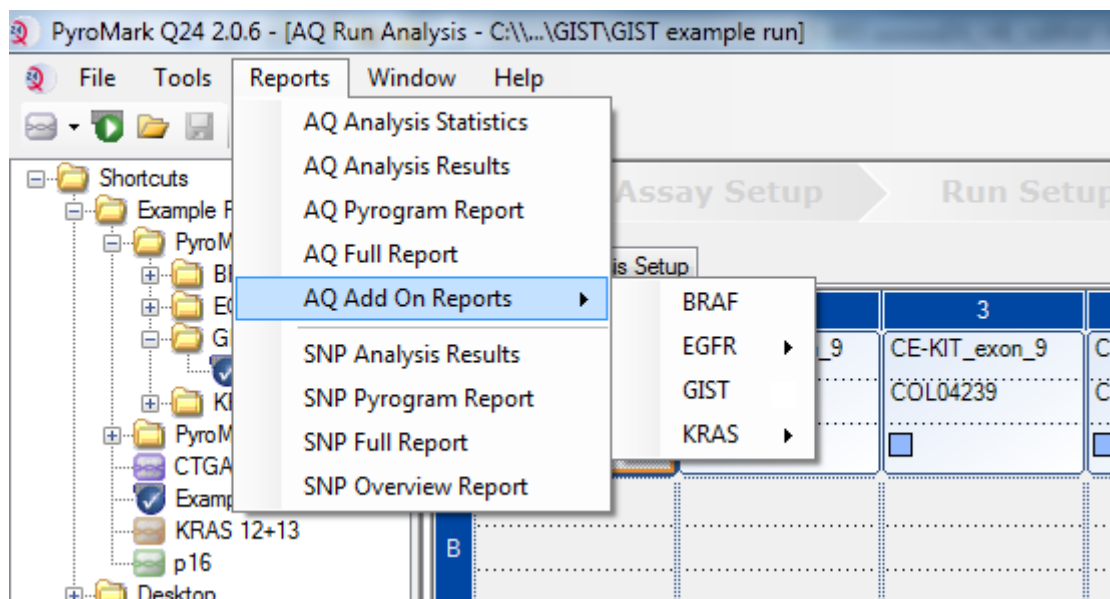


Ilustración 6. Menú GIST RapidScreen Plug-in Report.

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

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4,5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52,2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

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

Ilustración 7. GIST RapidScreen Plug-in Report.

- Si utiliza el análisis AQ:
Para analizar la serie analítica y obtener un resumen de los resultados, haga clic en uno de los botones de análisis.



Analizar todos los pocillos



Analizar el pocillo seleccionado

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

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

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

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

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

Se recomienda volver a analizar las muestras en las que no se ha detectado mutación con el valor estándar de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar) o cuyas valoraciones de calidad han obtenido los valores “Check” (Revisar) o “Failed” (Errónea).

El valor estándar de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar), tal como se ha definido en la configuración del análisis, cubre la duplicación de 6 bp en el exón 9 de *KIT* y la mutación puntual más habitual del codón 842 (GAC>GTC) del exón 18 de *PDFGRA* (consulte el Apéndice A, en la página 52). Si una muestra contiene una mutación menos frecuente en el exón 18 de *PDFGRA*, puede modificarse el valor de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar) para que se analice el estado mutacional de esta mutación, tal como se describe en el Apéndice A.

No se pueden analizar dos mutaciones complejas en el exón 18 de *PDGFRA* (2526_2538>G y 2524_2526GAC>TAT) mediante el análisis AQ del software PyroMark Q24. Se recomienda utilizar GIST RapidScreen Plug-in Report para el análisis de las mutaciones complejas del exón 18 de *PDGFRA*.

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

Para volver a analizar y detectar las mutaciones menos frecuentes, vaya a "Analysis Setup" (Configuración del análisis) y modifique el valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) según las variantes que se describen en el Apéndice A o las variantes de otras mutaciones raras o no previstas. Haga clic en "Apply" (Aplicar) y luego en "To All" (A todos) cuando aparezca la ventana "Apply Analysis Setup" (Aplicar configuración del análisis).

Las frecuencias actualizadas de las mutaciones en el gen *KIT/PDGFRA* humano se pueden descargar en línea desde el sitio Web del Instituto Sanger: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

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

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

Nota: si los picos medidos no coinciden con la altura de las barras del histograma y dicha diferencia no se debe a mutaciones raras o imprevistas, el resultado no puede considerarse válido para determinar el estado de la mutación. Se recomienda volver a analizar la muestra.

Interpretación de los resultados

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

Se recomienda incluir ADN de control no metilado en cada serie analítica para realizar la comparación y como control para los niveles de referencia. La frecuencia medida de la muestra de control debería ser inferior o igual que el límite de blanco (LOB). Se pueden utilizar los valores LOB (límite de blanco) y LOD (límite de detección) indicados en los manuales para determinar la presencia de una mutación. Estos valores se han obtenido a partir de mezclas de plásmidos que contenían la secuencia nativa o mutada correspondiente.

El análisis con el software PyroMark Q24 o con los complementos Plug-in Report puede dar 3 posibles resultados.

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

Nota: si utiliza GIST RapidScreen Plug-in Report (paso 5 de "Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24", en la página 31) y se da este caso, aparecerá un aviso.

El rango comprendido entre LOD y LOD + 3 unidades porcentuales permite detectar con un alto nivel de sensibilidad mutaciones de bajo nivel si se dan las condiciones adecuadas. Una frecuencia medida superior al LOB en la muestra de control no metilada 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. Por lo tanto, deben evaluarse detenidamente los resultados con la advertencia "Potential low level mutation" (Posible mutación de bajo nivel).

Las muestras cuyos resultados indican la posible presencia de una mutación de bajo nivel solamente se pueden considerar positivas para la mutación si dicha posibilidad se confirma al analizarlas por duplicado con ADN de control no metilado. El resultado de ambos duplicados debe indicar la misma mutación con valores $\geq LOD$ y la muestra de control debe generar el resultado "No mutation detected" (Mutación no detectada). De lo contrario, la muestra se considera "No mutation detected" (Mutación no detectada).

Para determinar si existe un fondo incrementado para la mutación, deben compararse los valores LOB indicados en el manual con las mediciones

obtenidas con el ADN de control no metilado. Las muestras cuyos resultados indican la posible presencia de una mutación de bajo nivel pueden clasificarse como "Mutation not detected" (Mutación no detectada) sin necesidad de repetición, siempre y cuando la frecuencia medida del ADN de control no metilado sea superior al valor LOB indicado en el manual para la mutación correspondiente. Por lo tanto, las posibles mutaciones de bajo nivel ofrecen 3 posibles escenarios distintos.

1. Frecuencia de medición con ADN de control no metilado $>$ LOB para la mutación: la muestra se clasifica como "Mutation not detected" (Mutación no detectada) sin necesidad de repetición.
2. Resultado no reproducido por duplicado con el mismo resultado: la muestra se clasifica como "Mutation not detected" (Mutación no detectada).
3. Obtención del mismo resultado en el análisis por duplicado con muestra nativa $<$ LOB para la mutación correspondiente: mutación detectada.

Nota: el pirograma debe compararse siempre con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana de pirograma. Los picos medidos deberían coincidir con la altura de las barras del histograma. Es necesario revisar los pirogramas 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 poco frecuentes o no previstas, se recomienda volver a analizar la muestra. El resultado erróneo no debe tenerse en cuenta para determinar el estado de la mutación. En el caso de las mutaciones válidas, un cambio en la altura del pico siempre está relacionado con un cambio en la altura de otro pico. Un cambio en la altura de un solo pico no debería ser considerado indicio de mutación.

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

Nota: la decisión de aplicar tratamiento a los pacientes de cáncer no se debe basar únicamente en el estado de mutación el exón 9 de *KIT* y el exón 18 de *PDGFRA*.

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

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LoB (unidades %)	LoD (unidades %)	COSMIC ID* (v58)
Exón 9 de <i>KIT</i>				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
Exón 18 de <i>PDGFRA</i>				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 o [‡]	D842_H845del o [‡]	2,2	5,2	737 o [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	6,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538>G [§]	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9	12397

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

[†] Las mutaciones 2524G>T y 2524_2526GAC>TAT, y 2526_2537del12 y 2527_2538del12 derivan en el mismo cambio de aminoácidos, respectivamente.

[‡] Las mutaciones 2524_2535del12 y 2526_2537del12 derivan en el mismo cambio de ácidos nucleicos.

[§] Las mutaciones 2526_2538>G y 2524_2526GAC>TAT no se pueden analizar en el modo AQ del software PyroMark Q24.

Resultados representativos

Los resultados representativos del pirograma se muestran en las ilustraciones 8-11.

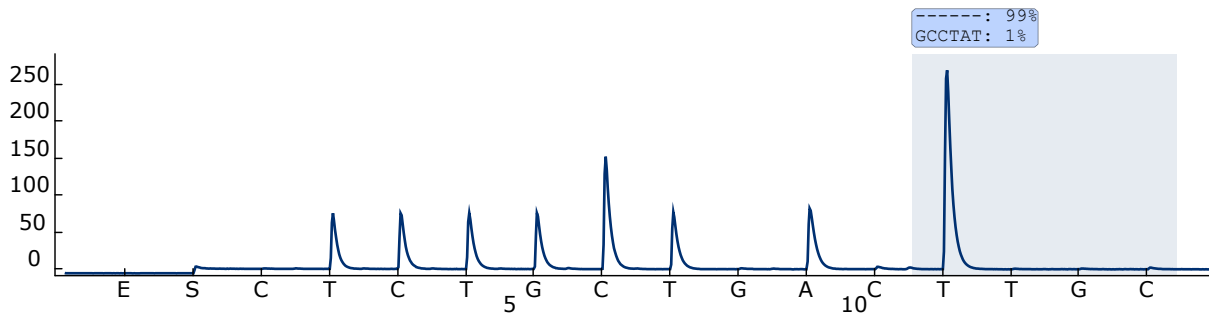


Ilustración 8. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo en el exón 9 de *KIT* con el valor *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) analizando la duplicación de 6 bp tras el codón 503.

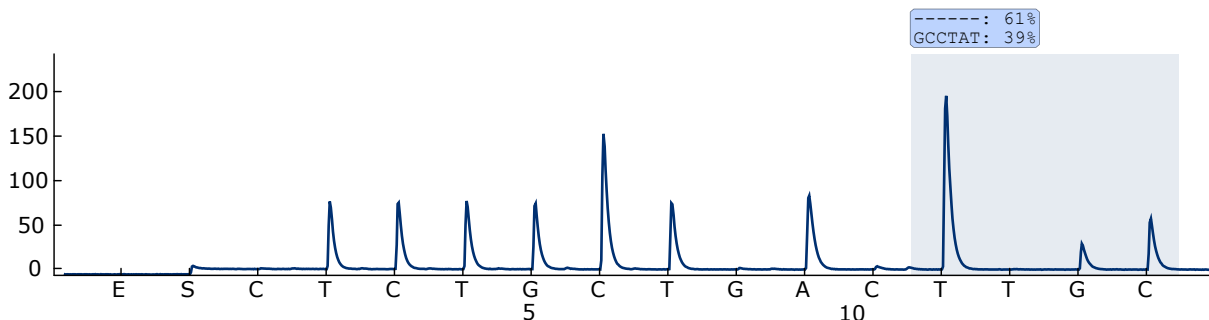


Ilustración 9. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con una duplicación de GCCTAT tras el codón 503 en el exón 9 de *KIT* con el valor *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).

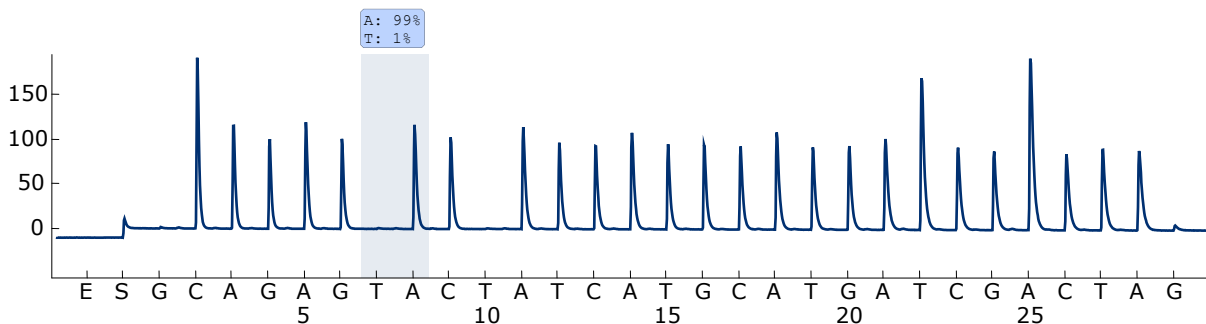


Ilustración 10. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo en el exón 18 de *PDGFRA* con el valor *CCAGAGWCATCATGCATGATTGCGAACTAT* para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) analizando la mutación GAC>GTC en el codón 842 (nucleótido 2525).

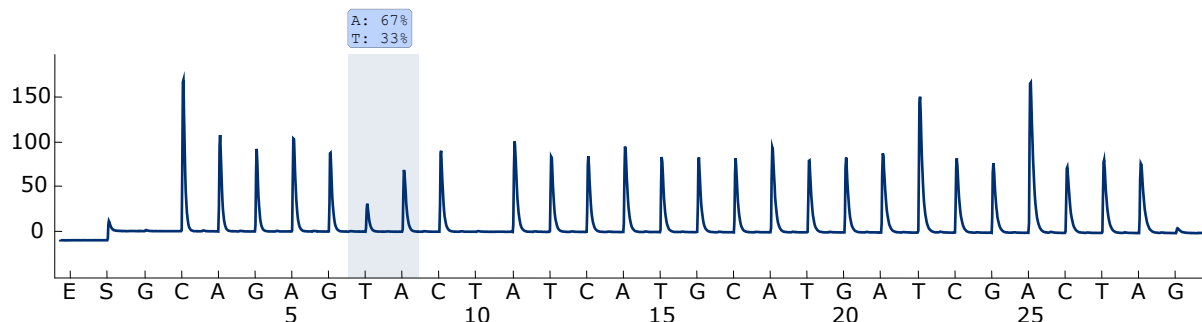


Ilustración 11. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con una mutación GAC>GTC en el codón 842 (nucleótido 2525) en el exón 18 de *PDGFRA* con el valor CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT para “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar).

Guía de resolución de problemas

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

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

Consulte el Manual de usuario de PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) para solucionar problemas de índole general del equipo.

Comentarios y sugerencias

Señales en el control sin molde (control negativo)

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

Comentarios y sugerencias

Secuencia débil o no esperada

ADN genómico de baja calidad

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

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

a) Altura de pico baja

La manipulación de errores durante la configuración de la PCR o la preparación de las muestras previa a la pirosecuenciación puede generar picos bajos.

Es importante que la herramienta de vacío succione totalmente las muestras. Procure que la herramienta de vacío descienda lentamente hacia las muestras y que la orientación de la placa de PCR o las tiras utilizadas para la inmovilización permita la succión total de las muestras.

Realice regularmente la prueba de funcionamiento de las sondas de filtros tal como se describe en el Manual de usuario de PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 Manual*) y sustitúyalas según se indique.

Si aparece la advertencia "Check" (Revisar), compare con detenimiento el pirograma con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana del pirograma. Si los picos medidos coinciden con la altura de las barras del histograma, el resultado puede considerarse válido. De lo contrario, se recomienda volver a analizar la muestra.

Comentarios y sugerencias

- b) Mutación no definida en "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) Ajuste la secuencia que se debe analizar en la configuración del ensayo (consulte "Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", en la página 52) y vuelva a analizar la serie.
- c) Mutación rara no prevista Un valor "Check" (Revisar) o "Failed" (Errónea) para la valoración de la calidad puede ser debido a un patrón de picos no esperado. Esta situación puede indicar una mutación no esperada y que, por lo tanto, no se analiza si se utiliza el valor indicado para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar). Estas muestras deberían analizarse utilizando los valores alternativos para "Sequences to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) teniendo en cuenta las mutaciones no previstas.
- d) Advertencia de desviación elevada en la altura del pico para una dispensación Compare el pirograma detenidamente con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana de pirograma. Si los picos medidos no coinciden con la altura de las barras del histograma y dicha diferencia no se debe a mutaciones poco frecuentes, se recomienda volver a analizar la muestra.

Fondo elevado

- a) Almacenamiento incorrecto de los nucleótidos Conserve los nucleótidos a 2-8 °C. Su almacenamiento a una temperatura comprendida entre -15 y -30 °C puede provocar un aumento del fondo.
- b) Tiempo de enfriamiento demasiado corto antes de realizar el análisis de pirosecuenciación Mantenga las muestras en un soporte para placas PyroMark Q24 a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. No reduzca el tiempo de enfriamiento.
- c) Contaminación del cartucho Limpie con cuidado el cartucho tal como se describe en la hoja del producto. Conserve el cartucho protegido de la luz y el polvo.

Comentarios y sugerencias

Ausencia de señales en el control positivo (ADN de control no metilado)

- | | |
|--|---|
| a) Mezcla de enzimas o de sustratos insuficiente para todos los pocillos | Asegúrese de llenar el cartucho PyroMark Q24 según la información de "Pre Run Information" (Información previa de la serie) que encontrará en el menú "Tools" (Herramientas). |
| b) Reactivos guardados o diluidos incorrectamente | Prepare los reactivos según las instrucciones descritas en "Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24", en la página 28. |
| c) Error de la PCR o de la preparación de las muestras | La manipulación de errores durante la configuración de la PCR, la programación del termociclador para PCR o la preparación de muestras previa a la pirosecuenciación pueden provocar la ausencia de señales. Realice regularmente la prueba de funcionamiento de las sondas de filtros tal como se describe en el Manual de usuario de PyroMark Q24 (<i>PyroMark Q24 User Manual</i>) y sustitúyalas según sea necesario. Repita la PCR y el análisis de pirosecuenciación. |

Control de calidad

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

Limitaciones

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

Siga todas las instrucciones del manual del usuario para obtener resultados de PCR óptimos. Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad impresas en las cajas y etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

Características de rendimiento

Límite de blanco y límite de detección

Se ha determinado el límite de blanco (LOB) y el límite de detección (LOD) de una serie de mutaciones utilizando mezclas de plásmidos (Tabla 10). Los límites LOB y LOD se han determinado según las recomendaciones de los requerimientos EP17-A del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI), "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline". Los errores α y β (falsos positivos y falsos negativos, respectivamente) se establecieron en un 5%. Los valores del LOD de algunas deleciones poco habituales en el exón 18 de *PDGFRA* se han determinado añadiendo 3 desviaciones estándar de las mediciones del blanco al valor del LOB. Los valores del LOD se establecieron como mínimo 3 unidades porcentuales por encima del valor del LOB.

Los valores del LOB representan la frecuencia medida obtenida con una muestra nativa. Los valores del LOD representan la señal más baja (frecuencia medida) que puede considerarse positiva para la mutación correspondiente.

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

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LOB (unidades %)	LOD (unidades %)	COSMIC ID* (v58)
Exón 9 de <i>KIT</i>				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
Exón 18 de <i>PDGFRA</i>				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 o [‡]	D842_H845del o [‡]	2,2	5,2	737 o [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [†]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	5,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2 [§]	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9 [§]	12406
2526_2538>G [¶]	D842_D846>E	0,3	3,3 [§]	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9 [§]	12397

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

[†] Las mutaciones 2524G>T y 2524_2526GAC>TAT, y 2526_2537del12 y 2527_2538del12 derivan en el mismo cambio de aminoácidos, respectivamente.

[‡] Las mutaciones 2524_2535del12 y 2526_2537del12 derivan en el mismo cambio de ácidos nucleicos.

[§] Los valores del LOD de estas deleciones en el exón 18 de *PDGFRA* se han determinado añadiendo 3 desviaciones estándar de las mediciones del blanco al valor del LOB.

[¶] La mutación 2526_2538>G no se puede analizar en el modo AQ del software PyroMark Q24.

Linealidad

La linealidad se ha determinado mediante mezclas de plásmidos que contenían la secuencia nativa o mutada de la duplicación 1509_1510insGCCTAT en el exón 9 de *KIT* y la mutación 2525A>T en el exón 18 de *PDGFRA*. Los plásmidos se mezclaron en diferentes proporciones hasta obtener 4 niveles de mutación (5, 10, 30 y 50%). Se analizó cada mezcla con 3 lotes distintos del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro en 3 análisis de pirosecuenciación con 3 réplicas cada uno.

Los resultados (n=9 para cada nivel de mutación) se analizaron según la directriz EP6-A del CLSI "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" con el software Analyse-it® v2.21, resultados que se muestran en las ilustraciones 12 y 13.

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

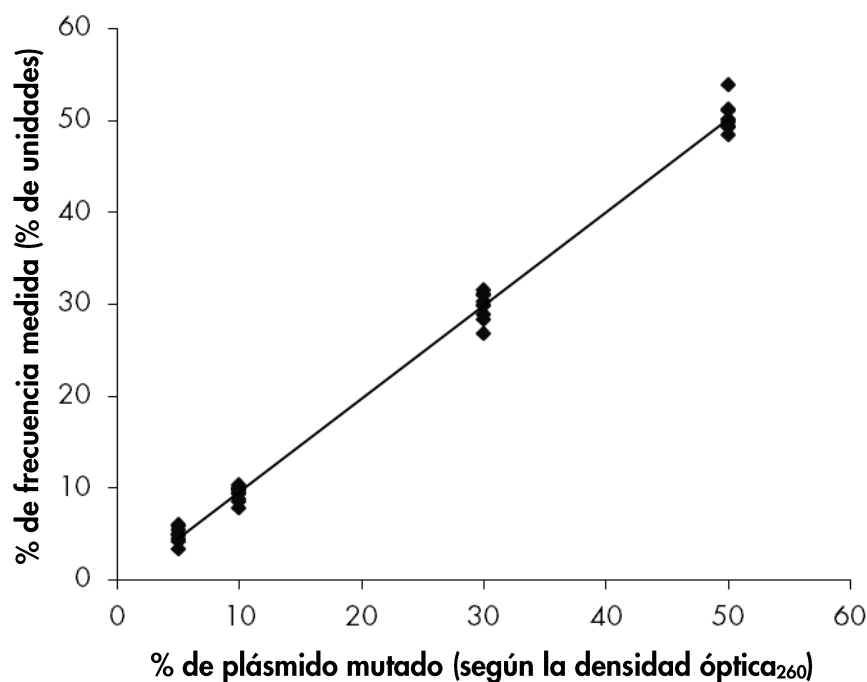


Ilustración 12. Linealidad de la duplicación 1509_1510insGCCTAT en el exón 9 de *KIT*.

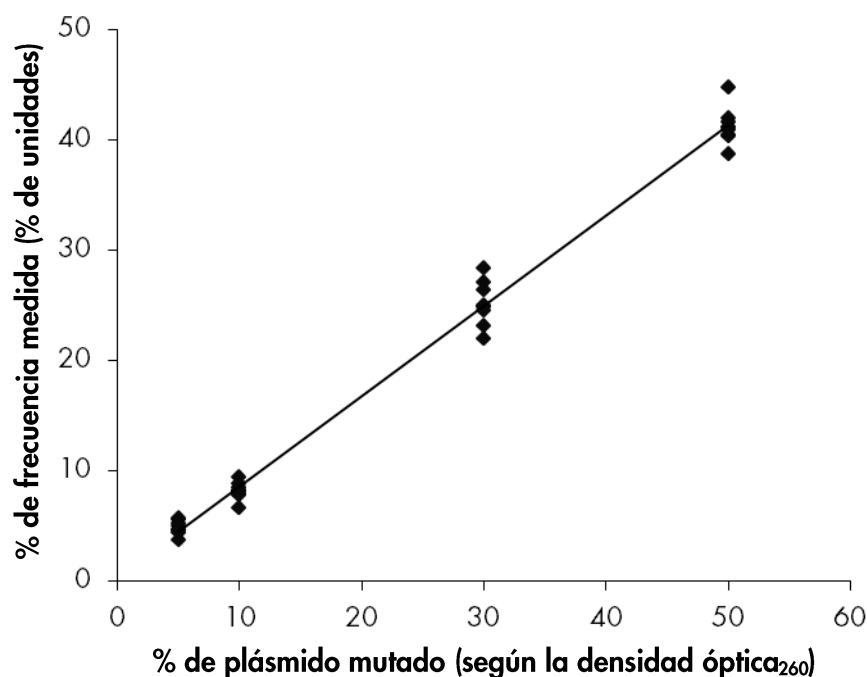


Ilustración 13. Linealidad de la mutación 2525A>T en el exón 18 de *PDGFRA*.

Precisión

Los datos de precisión que permiten determinar la variabilidad total de los ensayos se obtuvieron de 3 niveles distintos del análisis de las mezclas de plásmidos mencionadas anteriormente con 3 réplicas cada una.

La repetibilidad (variabilidad intraensayo e interlote) se calculó a partir de los datos obtenidos para la determinación de la linealidad (3 análisis realizados el mismo día con diferentes lotes del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro). La precisión intermedia (variabilidad intralaboratorio) se determinó en 3 análisis realizados en un único laboratorio en 3 días distintos y con usuarios, equipos PyroMark Q24 y lotes del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro diferentes. La reproducibilidad (variabilidad interlaboratorio) se calculó a partir de 2 análisis realizados cada uno en un laboratorio interno y en otro externo y utilizando lotes diferentes del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Las estimaciones de precisión se expresan en forma de desviación estándar de las frecuencias de mutación medidas en unidades porcentuales (tabla 11). Los valores de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad para la duplicación 1509_1510insGCCTAT en el exón 9 de *KIT* fueron de 0,8-1,6, 0,5-1,5 y 0,7-1,9 de unidades porcentuales, respectivamente, en el intervalo medido con un nivel de mutación comprendido entre el 5 y el 50%. Los valores de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad para la mutación 2525A>T en el exón 18 de *PDGFRA* fueron de 0,6-1,9, 0,6-3,7 y 0,5-2,4

de unidades porcentuales, respectivamente, en el intervalo medido con un nivel de mutación comprendido entre el 5 y el 50%.

Tabla 11. Precisión de la duplicación 1509_1510insGCCTAT en el exón 9 de *KIT**

% de plásmido mutado [†]	Repetibilidad		Precisión intermedia		Reproducibilidad	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
5	4,9	0,8	4,6	0,5	4,6	0,7
10	9,3	0,8	9,3	1,2	9,3	0,9
30	29,7	1,5	29,2	1,2	29,2	1,7
50	50,3	1,6	50,2	1,5	49,7	1,9

Todos los valores se indican como % de unidades. SD: desviación estándar (n=9).

[†] Según la medición de la densidad óptica OD₂₆₀.

Tabla 12. Precisión de la mutación 2525A>T en el exón 18 de *PDGFRA*‡

% de plásmido mutado [§]	Repetibilidad		Precisión intermedia		Reproducibilidad	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
5	4,8	0,6	4,8	0,6	5,0	0,5
10	8,2	0,8	7,7	0,7	8,8	1,0
30	25,1	1,9	23,6	3,4	26,6	1,4
50	41,2	1,6	40,5	3,7	43,3	2,4

[‡] Todos los valores se indican como % de unidades. SD: desviación estándar (n=9).

[§] Según la medición de la densidad óptica OD₂₆₀.

Evaluación diagnóstica

La evaluación del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro se ha realizado mediante una comparación con el método de secuenciación Sanger. Se extrajo ADN de 100 muestras de tumores GIST fijadas en formalina e impregnadas en parafina (FFPE) y se analizaron en busca de mutaciones en el exón 9 de *KIT* y el exón 18 de *PDGFRA*.

El ADN se aisló mediante el kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Los análisis se realizaron con el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro en PyroMark Q24. La secuenciación Sanger se llevó a cabo en Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer.

De las 100 muestras analizadas, se pudo determinar el estado mutacional de todos los exones 9 de *KIT* (ilustración 13) y los exones 18 de *PDGFRA* (ilustración 14) con ambos métodos.

Tabla 13. Resultados de las muestras de tumores GIST analizadas en el exón 9 de *KIT*

Exón 9 de <i>KIT</i>		Secuenciación Sanger		
		Mutación no detectada	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	Total
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Mutación no detectada	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	Total	92	8	100

Tabla 14. Resultados de las muestras de tumores GIST analizadas en el exón 18 de *PDGFRA*

Exón 18 de <i>PDGFRA</i>		Secuenciación Sanger				Total
		Nativo	2530-2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	
Manual de uso del kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Mutación no detectada	92	0	0	0	92
	2530-2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	Total	93	2	3	2	100

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

Referencias

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

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

Citas bibliográficas

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23** (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* **17** (Supplement 10), x280.

Símbolos

El embalaje y las etiquetas pueden incluir los siguientes símbolos:



<N>

Contiene suficientes reactivos para <N> pruebas



Fecha de caducidad



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



N.º de referencia



Número de lote



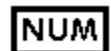
Número de material



Componentes



Contenido



Número



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso



Precaución

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visite nuestro Centro de servicio técnico en el sitio www.qiagen.com/Support, llame al 00800-22-44-6000, póngase en contacto con uno de los departamentos del servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Si se ha instalado GIST RapidScreen Plug-in Report, encontrará las configuraciones de ensayo predefinidas para el exón 9 de *KIT* y el exón 18 de *PDGFRA* en el navegador de accesos directos del software PyroMark Q24, en la ruta "Example Files/PyroMark Setups/GIST". No es necesario llevar a cabo los siguientes pasos. Puede obtener GIST RapidScreen Plug-in Report a través de la dirección pyro.plugin@qiagen.com.

Se recomienda utilizar GIST RapidScreen Plug-in Report en lugar de efectuar un análisis manual. Las mutaciones complejas del exón 18 de *PDGFRA* no pueden añadirse manualmente a "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar), por lo que deben analizarse con GIST RapidScreen Plug-in Report. Una vez instalado el complemento o cada vez que actualice un software o instale uno nuevo en el ordenador del laboratorio, deberá comprobar el funcionamiento correcto del mismo tal y como se describe en el documento GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide (Guía rápida de GIST RapidScreen Plug-In).

Si GIST RapidScreen Plug-in Report no se ha instalado, los archivos de ensayo deben configurarse manualmente antes de ejecutar los ensayos del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro por primera vez. Configure el ensayo para el exón 9 de *KIT* y el exón 18 de *PDGFRA* mediante el software PyroMark Q24, tal como se describe a continuación.

Procedimiento

Exón 9 de *KIT*

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

A2. Introduzca manualmente el siguiente valor para "Dispensation Order" (Orden de dosificación):
CTCTGCTGACTTGC

A3. Escriba la siguiente secuencia en "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar):
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA

La duplicación de 6 bp GCCTAT tras el codón 503 en el exón 9 de *KIT* se detectará mediante este valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).

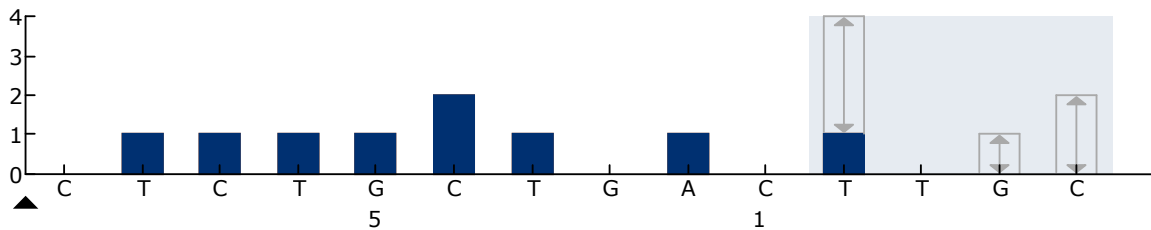




Ilustración 14. Histograma del exón 9 de *KIT* con el valor *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* para la opción "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) analizando la duplicación de 6 bp tras el codón 503.

- A4.** Haga clic en la pestaña "Analysis Parameters" (Parámetros de análisis) y aumente el valor de "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Umbral de altura del pico: altura de pico necesaria para calidad garantizada) hasta 30.
- A5.** Haga clic en  en la barra de herramientas y guarde el ensayo como "Exón 9 de KIT".

Exón 18 de *PDGFRA*

- A1.** Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione "New AQ Assay" (Nuevo ensayo AQ).
- A2.** Añada manualmente el siguiente valor para "Dispensation Order" (Orden de dosificación):
GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG
- A3.** Escriba la siguiente secuencia en "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).
CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGAACTAT

La mutación GAC>GTC, la más habitual del codón 842 (nucleótido 2525) del exón 18 de *PDGFRA*, se detectará mediante este valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).

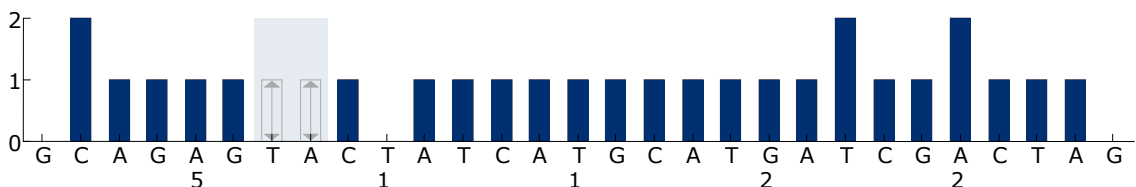


Ilustración 15. Histograma del exón 18 de *PDGFRA* con el valor *CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGAACTAT* para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) analizando la mutación GAC>GTC en el codón 842 (nucleótido 2525).

El valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) puede modificarse después de la serie para analizar de forma adicional las mutaciones del nucleótido 2524 (codón 842), así como de las 9 deleciones y mutaciones complejas dentro de la región del códon 842 al 847.

Para comprobar si existen las siguientes mutaciones, cambie el valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) según la tabla 15.

Nota: se puede ignorar la advertencia "Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations" (La cuantificación puede ser indefinida: la posición de la variable requiere más de 5 dispensaciones) que aparece durante la configuración del ensayo.

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

A4. Haga clic en la pestaña "Analysis Parameters" (Parámetros de análisis) y aumente el valor de "Peak Height Threshold Required peak height for Passed quality:" (Umbral de altura del pico: altura de pico necesaria para calidad garantizada) hasta 30.

A5. Haga clic en  en la barra de herramientas y guarde el ensayo como "Exón 18 de PDGFRA".

Tabla 15. Mutaciones comunes detectadas por el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro mediante valores diferentes de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar)

Cambio de ácidos nucleicos	Cambio de aminoácidos	"Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar)
Exón 9 de <i>KIT</i>		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTTAA*
Exón 18 de <i>PDGFRA</i>		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTCTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y [†]	CCAGAKACATCATGCAT GATTCTCGAACTAT
2524_2535del12 o [‡] 2526_2537del12	D842_H845del o [‡] I843_D846del [†]	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2527_2538del12	I843_D846del [†]	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT

2528_2539del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT
2530_2541del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTCG] AACTATGTGT
2524_2532del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTCGAACTAT
2524_2526delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCGAACTAT
2526_2538>G	D842_D846>E	– [§]
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	– [§]


* Valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) estándar.

† Las mutaciones 2524G>T y 2524_2526GAC>TAT, y 2526_2537del12 y 2527_2538del12 derivan en la misma sustitución de aminoácidos, respectivamente.

‡ Las mutaciones 2524_2535del12 y 2526_2537del12 derivan en la misma sustitución de ácidos nucleicos y se analizar con el mismo valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).

§ Las mutaciones 2526_2538>G y 2524_2526GAC>TAT no se pueden analizar en el modo AQ del software PyroMark Q24.

Apéndice B: Vaciado del contenedor de residuos y los contenedores

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

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

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

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

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

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Este protocolo utiliza agua ultrapura (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com o equivalente).

Procedimiento

B1. Asegúrese de que no se aplique vacío a la herramienta de preparación de vacío. Asegúrese de que el vacío está cerrado (Off) y de que la bomba de vacío está desconectada.

B2. Elimine las soluciones restantes en los contenedores.

B3. Lave los contenedores con agua ultrapura o, si es necesario, sustitúyalos.

B4. Vacíe el contenedor de residuos.

el tapón puede extraerse sin desconectar el tubo.

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

Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	Para 24 reacciones en sistemas PyroMark Q24: primers de secuenciación, primers de PCR, ADN de control no metilado, mezcla maestra para PCR PyroMark, concentrado CoralLoad, tampón de unión PyroMark, tampón de hibridación PyroMark, solución de desnaturalización PyroMark, tampón de lavado PyroMark, mezcla de enzimas, mezcla de sustratos, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP y H ₂ O	971510
PyroMark Q24 MDx	Plataforma para la detección de secuencias mediante pirosecuenciación de 24 muestras en paralelo	9001513
PyroMark Q24	Plataforma para la detección de secuencias mediante pirosecuenciación de 24 muestras en paralelo	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Estación de vacío (220 V) para la preparación de 24 muestras en paralelo, desde el producto de PCR al molde monocatenario	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Estación de vacío para la preparación de 24 muestras en paralelo, desde el producto de PCR al molde monocatenario	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Software de la aplicación	9019063
PyroMark Q24 Software	Software de análisis	9019062

* Solamente Reino Unido.

† Resto del mundo.

Producto	Contenido	Referencia
Accesorios		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reacción para secuenciación de 24 pocillos	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para la dosificación de nucleótidos y reactivos	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas con filtro reutilizables para las estaciones de vacío PyroMark Q96 y Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Para la comprobación de la instalación del sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para la confirmación del rendimiento del sistema	979304
Productos relacionados		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparados de ADN: 50 columnas QIAamp MinElute®, proteinasa K, tampones, tubos de recogida (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Para 48 preparados: cartuchos de reactivos (tejido), puntas con filtro desechables, soportes de puntas desechables, tubos de muestras (2 ml), tubos de dilución (1,5 ml), tampón G2, proteinasa K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparados: columnas QIAamp Mini Spin, tampones, reactivos, tubos, equipos VacConnectors	61104

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

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, Coraload®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Applied Biosystems® (Life Technologies Corporation); FrameStar® (4fitude Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries); Windows® (Microsoft Corporation).

Acuerdo de licencia limitada para el kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

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

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

HB-1547-002 © 2013-2015 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

