

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



Versão 1



Para utilização em diagnóstico in vitro



REF 971061

HB 1061267PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R4 **MAT** 1061267PT



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	12
Informações de segurança	12
Precauções gerais	12
Armazenamento e manuseamento de reagentes	13
Armazenamento e manuseamento de amostras	14
Procedimento	15
Isolamento de ADN e conversão de bissulfito	15
Protocolos	
■ 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24	16
■ 2: PCR com os reagentes fornecidos com o kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro	19
■ 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de Streptavidin Sepharose High Performance	22
■ 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24	24
■ 5: Execução do PyroMark Q24	28
■ 6: Análise de uma execução PyroMark Q24	31
Interpretação de resultados	32
Guia de resolução de problemas	34
Controlo de qualidade	37
Limitações	37
Características de desempenho	38
Limite em branco	38
Linearidade	38

Precisão	40
Avaliação de diagnóstico	43
Bibliografia	45
Símbolos	46
Informações de contacto	46
Anexo A: Preparação do ensaio MGMT	47
Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos	48
Informações para encomendar	50

Utilização prevista

O kit *therascreen* MGMT Pyro é um teste de detecção *in vitro* de ácido nucleico com base em sequências, baseado em tecnologia de Pyrosequencing[®], para as medições quantitativas do estado de metilação no exão 1 do gene humano MGMT, no ADN genómico derivado de amostras de tecido humano.

O kit MGMT Pyro *therascreen* foi concebido para ser utilizado como auxiliar de outros factores de prognóstico e destina-se a fornecer aos médicos informações para ajudar na selecção de doentes com cancro com maior probabilidade de beneficiar do tratamento de quimioterapias. 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* MGMT Pyro serve para medições quantitativas de metilação em quatro locais CpG no exão 1 do gene humano MGMT (sequência genómica no cromossoma 10 de 131 265 519 a 131 265 537:

CGACGCCCGCAGGTCCTCG). O ADN genómico convertido de bissulfito é amplificado por PCR e sequenciado pela região definida na direcção para a frente (imagem 1). As sequências em redor das posições definidas servem como picos de normalização e de referência para a quantificação e avaliação da qualidade da análise.

O produto consiste numa mistura de iniciadores de PCR e num iniciador de sequenciação, dois frascos de cada. Os iniciadores são fornecidos em solução. Cada frasco contém 24 µl de iniciador ou mistura de iniciadores. O kit contém iniciadores e reagentes para amplificação dos genes, mais soluções tampão, iniciadores e reagentes para detecção de metilação quantitativa em tempo real, utilizando tecnologia de piro-sequenciação no sistema PyroMark Q24.

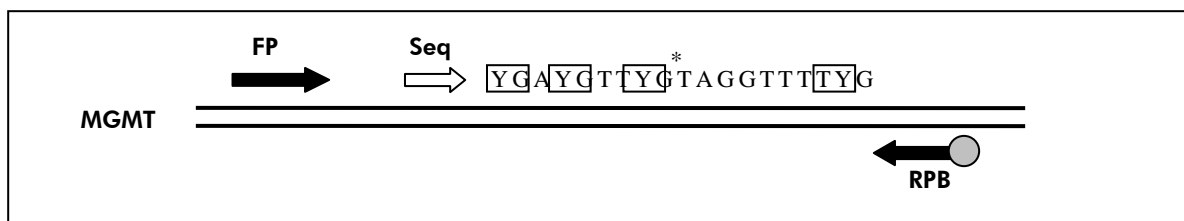


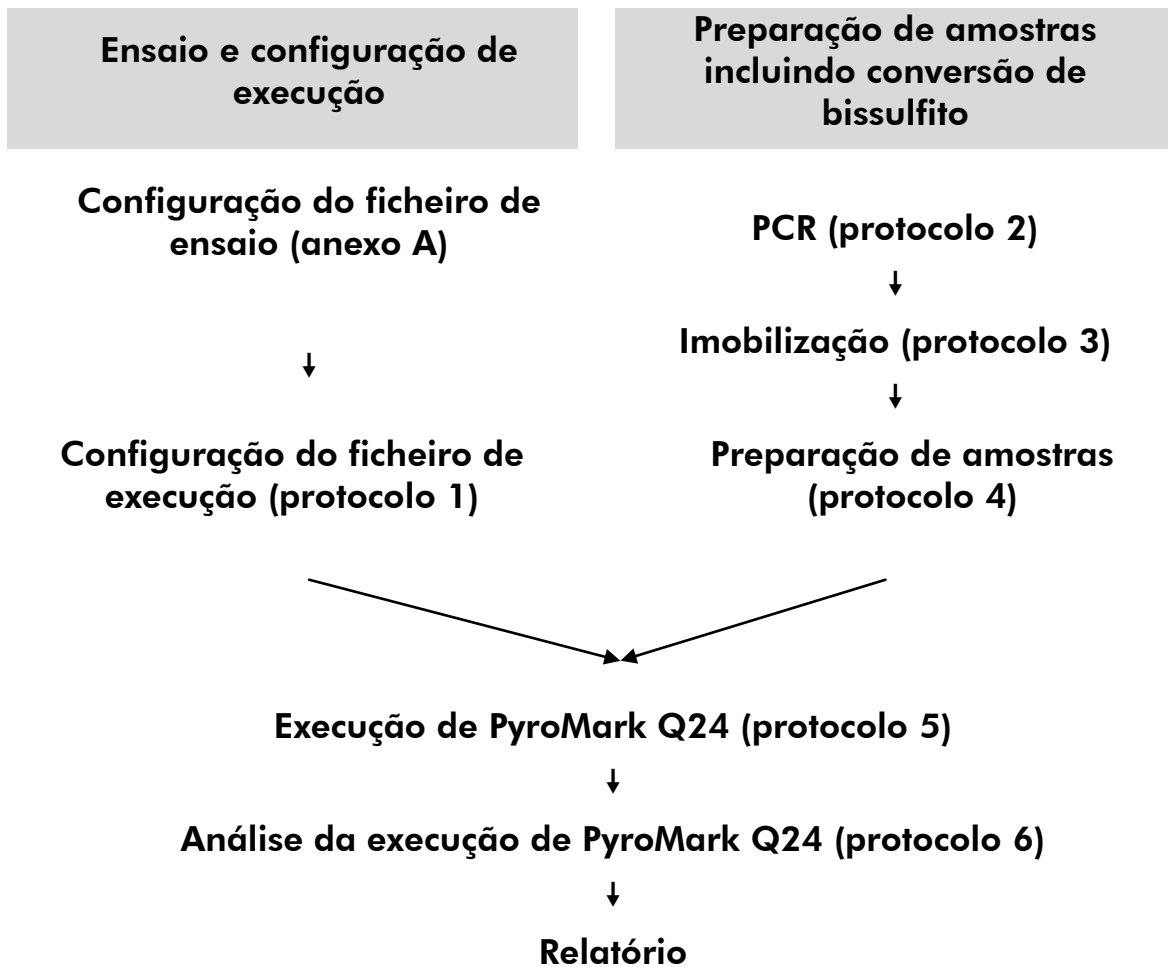
Imagem 1. Ilustração do ensaio de MGMT. A sequência indicada é a sequência analisada após a conversão de bissulfito. Y indica os locais potencialmente metilados e as caixas indicam os locais CpG analisados. O asterisco indica o local para o controle de conversão de bissulfito. **FP**: Iniciadores de PCR para a frente; **RPB**: Iniciadores de PCR de inversão (**B** indica biotilação); **Seq**: Iniciadores de sequenciação.

Princípio do procedimento

O fluxo de trabalho a seguir ilustra o procedimento de ensaio. Depois de a PCR usar iniciadores que visam a região definida do exão 1, os amplicons são imobilizados em bandas de Streptavidin Sepharose® High Performance. É preparado ADN de cadeia simples e o iniciador de sequenciação é hibridizado para o ADN. Em seguida, as amostras são analisadas no sistema PyroMark Q24, usando um ficheiro de configuração de 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 24).

Fluxo de trabalho do procedimento de Pyro *therascreen* MGMT



Controlos

O ADN de controlo metilado está incluído no kit como um controlo positivo da PCR e reacções de sequenciação. Este ADN de controlo é altamente metilado e convertido de bissulfito. Recomenda-se também que uma amostra de ADN derivada de sangue de dador saudável seja incluída em cada execução de piro-sequenciação para comparação. Além disso, deve ser incluído um controlo negativo (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR.


Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

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

Kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro	(48)
Ref.^o	971061
Número de reacções	48
PCR Primer Mix MGMT (Mistura de iniciadores de PCR MGMT)	2 x 24 µl
Seq Primer MGMT (Iniciador de Seq MGMT)	2 x 24 µl
PyroMark PCR Master Mix (Mistura principal de PCR PyroMark), 2x	850 µl
CoralLoad [®] Concentrate (Concentrado CoralLoad [®]), 10x	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Methylated Control DNA (ADN de controlo metilado), 10 ng/µl	100 µl

therascreen Pyro buffers and reagents (caixa 2/2)

therascreen Pyro buffers and reagents		
PyroMark Binding Buffer (Tampão de ligação PyroMark)		10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Tampão de "annealing" PyroMark)		10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Solução de desnaturação PyroMark)*		250 ml
PyroMark Wash Buffer (Tampão de lavagem PyroMark), 10x		25 ml
Enzyme Mixture (Mistura de enzimas)		1 frasco
Substrate Mixture (Mistura de substrato)		1 frasco
dATP α S		1180 μ l
dCTP		1180 μ l
dGTP		1180 μ l
dTTP		1180 μ l
Handbook (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 e conversão de bissulfito”, página 15)
- Reagentes para conversão de bissulfito do ADN (consulte “Isolamento de ADN e conversão de bissulfito”, página 15)
- 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.ª 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- PyroMark Q24 (ref.ª 9001513 ou 9001514)*†
- Software de PyroMark Q24 (ref.ª 9019062 ou 9019063)†
- Placa PyroMark Q24 (ref.ª 979201)†
- Cartucho de PyroMark Q24 (ref.ª 979202)†
- Estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 (ref.ª 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

* 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.

- 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%)*

Misturadores de placas recomendados

Os misturadores de placas indicados no Quadro 1 são recomendados para utilização com o kit *therascreen* MGMT Pyro.

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

Fabricante	Produto	Ref. ^a
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)

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

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico

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 MSDS para cada kit QIAGEN® e componente de kit.

As seguintes advertências de precaução e de perigo aplicam-se aos componentes do kit *therascreen* MGMT 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 otimizados. Não se recomenda a diluição de reagentes não descritos neste manual pois pode resultar numa redução do seu desempenho.
- Tenha em atenção que 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 24).
- Os componentes deste produto são suficientes para executar as 48 reacções em até 5 execuções independentes.
- Utilize pontas de pipeta esterilizadas com filtros (para configuração da PCR).
- Armazene e extraia materiais positivos (amostras, controlos positivos e amplicons) separadamente de todos os reagentes restantes e adicione-os à mistura de reacção numa instalação em separado.
- Descongele completamente todos os componentes à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar um ensaio.
- Quando estiver descongelado, misture os componentes (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 de estado de metilação.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

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

As soluções tampão e os reagentes *therascreen 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* MGMT 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 convertido de bissulfito 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 e conversão de bissulfito

O desempenho do sistema foi estabelecido através do kit EZ1[®] DNA Tissue e do kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue para a extracção de ADN humano de amostras de tumor fixadas em formalina e 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* MGMT Pyro. Efectuar a purificação de ADN de acordo com as instruções dos manuais do kits.

Para a conversão de bissulfito, recomenda-se o kit EpiTect[®] Bisulfite (ref.^o 59104), o kit EpiTect Plus FFPE Bisulfite (ref.^o 59144) ou o kit EpiTect Plus DNA Bisulfite (ref.^o 59124) da QIAGEN.

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

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

* 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).

[†] Com símbolo CE-IVD, conforme a directiva europeia 98/79/CE.

Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24



Aspecto importante antes do início do procedimento

- Se necessário, o LOB pode ser confirmado ao utilizar uma amostra de sangue de dador saudável para gerar uma placa inteira de resultados. Para mais informações, consulte a directriz EP17-A do CLSI “Protocolo para a determinação dos limites de detecção e limites de quantificação; directriz aprovada”.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Crie uma configuração de ensaio, como descrito no anexo A, página 47. Isto tem de ser feito apenas uma vez, antes de executar o ensaio *therascreen* MGMT 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 17).**
3. **Configure a placa ao adicionar o ensaio nos poços correspondentes às amostras a analisar.**
Nota: Deve ser incluída uma amostra de controlo negativo (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR.
Nota: Recomenda-se também incluir uma amostra de controlo com ADN de um dador de sangue saudável de cada execução de piro-sequenciação para comparação. Uma amostra com ADN de controlo metilado pode ser incluída 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 sistema PyroMark Q24, imprima uma lista dos volumes necessários de mistura de enzimas, mistura de substrato e nucleótidos e a configuração da placa. Selecione “Pre Run Information” (Informações de pré-execução) do menu “Tools” (Ferramentas) e, quando o relatório aparece, clique em .**
5. **Feche o ficheiro de execução e copie-o para um dispositivo de armazenamento de dados USB (fornecido com o sistema), 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 22).

Para executar a placa no PyroMark Q24, consulte “Protocolo 5: Execução do PyroMark Q24”, página 28.

Parâmetros de execução

Run name (Nome de execução):	O nome da execução é atribuído quando o ficheiro é guardado. Ao mudar o nome do ficheiro também altera o nome da execução.
Instrument method (Método do equipamento):	Seleccione o método do equipamento de acordo com o cartucho que será utilizado na execução. Consultar as instruções fornecidas com os produtos.
Plate ID (ID da placa):	Opcional: Introduza a ID da placa PyroMark Q24.
Bar code (Código de barras):	Opcional: Introduza 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.
Reagent ID (ID de reagente):	Opcional: Introduza os números de lote caixa 1 e caixa 2 do kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro a usar. Pode encontrar o número de lote no rótulo do produto. Nota: Recomenda-se a introdução do número de lote para que seja possível detectar quaisquer problemas inesperados com o kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro.
Run note (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* MGMT Pyro

Este protocolo serve para a amplificação de PCR de uma região de ADN convertido de bissulfite, utilizando o kit *therascreen* MGMT 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 ADN convertido de bissulfite tem de ser usado como modelo de ADN. Recomenda-se o kit EpiTect Bisulfite (ref.^o 59104), o kit EpiTect Plus FFPE Bisulfite (ref.^o 59144) ou o kit EpiTect Plus DNA Bisulfite (ref.^o 59124) da QIAGEN.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Antes de abrir o tubo com iniciador 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 2 a 10 ng/ μ l.

Procedimento

1. Descongele todos os componentes necessários.

Misture bem antes da utilização.

2. Prepare uma mistura de reacção 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 da mistura de reacção

Componente	Volume/reacção (μ l)
Mistura principal de PCR PyroMark, 2x	12,5
Concentrado CoralLoad, 10x	2,5
Mistura de iniciadores de PCR MGMT	1,0
Água (H ₂ O, fornecida)	4,0
Volume total	20,0

3. Misture cuidadosamente a mistura de reacção e distribua 20 μ l 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 μ l de modelo de ADN convertido de bissulfito (10 a 50 ng de ADN genómico como medido antes da conversão de bissulfito) aos tubos de PCR individuais (quadro 4) e misture cuidadosamente.

Nota: Deve ser incluída uma amostra de controlo negativo (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR.

Nota: Recomenda-se também incluir uma amostra de controlo com ADN de um dador de sangue saudável de cada execução de piro-sequenciação para comparação. Uma amostra com ADN de controlo metilado pode ser incluída como um controlo positivo da PCR e reacções de sequenciação (consulte "Controlos", página 7).

Quadro 4. Preparação de PCR

Componente	Volume/reacção (μ l)
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 activação inicial:	15 minutos	95 °C	A polimerase HotStarTaq de ADN é activada por este passo de aquecimento.
Ciclagem de 3 passos:			
Desnaturação	20 segundos	95 °C	
Annealing	30 segundos	53 °C	
Extensão	20 segundos	72 °C	
Número de ciclos	42		
Extensão final:	5 minutos	72 °C	

6. Coloque os tubos de PCR no termociclador e inicie o programa de ciclagem.
7. Após a amplificação, continue com o "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de Streptavidin Sepharose High Performance", página 22.

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.

Aspectos importantes antes do início do 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_2O , 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 16).**
4. **Adicione 10 μl de produto de PCR biotinilado 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* MGMT Pyro”, página 19).**
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 24.

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

- Adicione o iniciador de sequenciação no mesmo padrão, como pré-definido para a placa na configuração da execução (consulte “Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24”, página 16).
- 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

- Antes de abrir o tubo com iniciador de sequenciação, centrifugue com brevidade para assegurar a concentração dos conteúdos no fundo dos tubos.
- 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 de 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 do iniciador de sequenciação, iniciador de Seq MGMT, 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 do iniciador de sequenciação

Componente	Volume/amostra (μl)	Volume para reacções 9 + 1 (μl)
Iniciador de Seq MGMT	0,8	8,0
Tampão de "annealing" PyroMark	24,2	242,0
Volume total	25,0	250,0

- 2. Adicione 25 μl do iniciador de sequenciação diluído a cada poço da placa PyroMark Q24, de acordo com a configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", página 16).**

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 (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 para a ferramenta de vácuo na direcção da placa de PCR (ou tiras) para captar as bandas que contêm modelo imobilizado. Mantenha as sondas no lugar durante 15 segundos. Tenha cuidado ao 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 de vácuo 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, página 48).
- 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 28.**

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 16), 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.

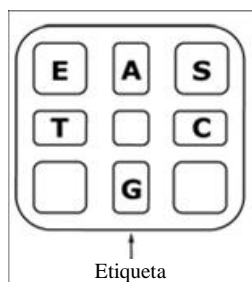


Imagem 4. Ilustração do cartucho PyroMark Q24 visto de cima. As anotações correspondem ao rótulo nos frascos de reagente. Adicione mistura de enzimas (**E**), mistura de substrato (**S**), e nucleótidos (**A**, **T**, **C**, **G**) de acordo com a informação do volume indicada no relatório de informações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

6. **Abra a porta do compartimento dos cartuchos e introduza o cartucho cheio de reagente, com 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 31.**

Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24

Este protocolo descreve a análise de metilação de uma execução de *therascreen* MGMT 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 CpG 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.

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

5. **Para criar um relatório, seleccione "CpG Full Report" (Relatório completo CpG) ou "CpG Analysis Results" (Resultados de análise CpG) 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, página 47 e o *Manual de Utilizador do PyroMark Q24*).

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

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

Interpretação de resultados

Recomenda-se também que uma amostra de ADN derivada de sangue de dador saudável seja incluída em cada execução para comparação.

O controlo de conversão de bissulfito (marcado por uma barra amarela na janela do pirograma) indica a totalidade da conversão de bissulfito. Um sinal no controlo de conversão de bissulfito pode indicar uma conversão de bissulfito incompleta, que pode resultar na quantificação de metilação preconcebida e irá gerar um aviso.

Os valores do limite em branco (LOB) representam frequências de metilação obtidas de amostras de sangue de dador saudável com uma probabilidade de 95% (consulte quadro 8 e “Características de desempenho”, página 38).

Quadro 8. LOB determinado para locais de metilação específicos utilizando amostras de sangue de dadores saudáveis

Posição	LOB (unidades de %)
Local 1 CpG	1,5
Local 2 CpG	1,8
Local 3 CpG	3,2
Local 4 CpG	3,4
Média de CpG, local 1 a 4	2,1

Nota: Estes valores basearam-se nas execuções em que o sinal era superior a 30 unidades de luz relativa (RLU), obtidos repetidamente de 10 ng de ADN isolado de sangue (medido antes da conversão de bissulfito). Recomendamos a confirmação do desempenho do método no laboratório.

Resultados representativos

Os resultados representativos do pirograma estão apresentados nas imagens 5 a 7.

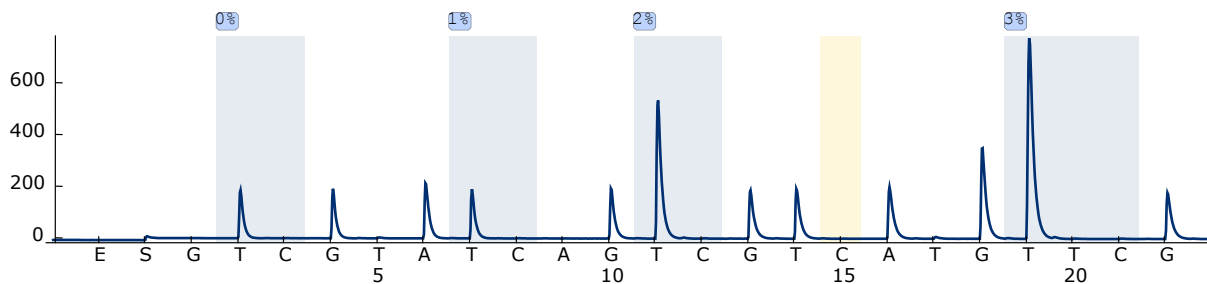


Imagem 5. Curva de pirograma obtida após a análise de ADN convertido de bissulfito não metilado derivado de amostra de sangue de dador saudável. A barra durante a distribuição 15 representa o controlo para concluir a conversão de bissulfito.

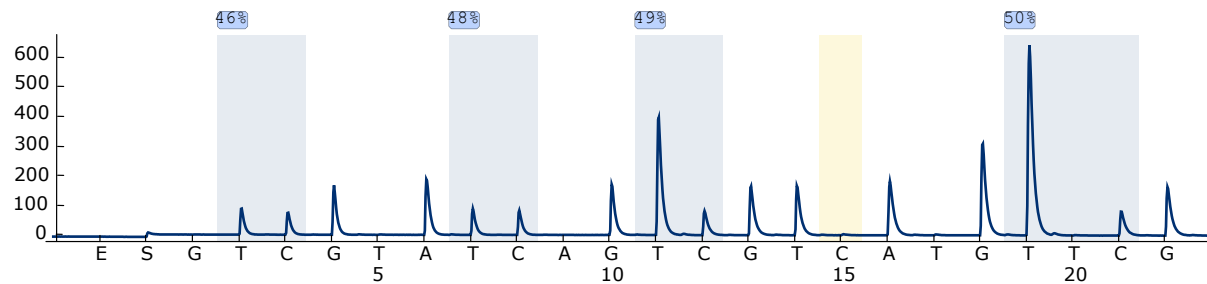


Imagem 6. Curva de pirograma obtida após a análise de ADN convertido de bissulfito metilado. A barra durante a distribuição 15 representa o controlo para concluir a conversão de bissulfito.

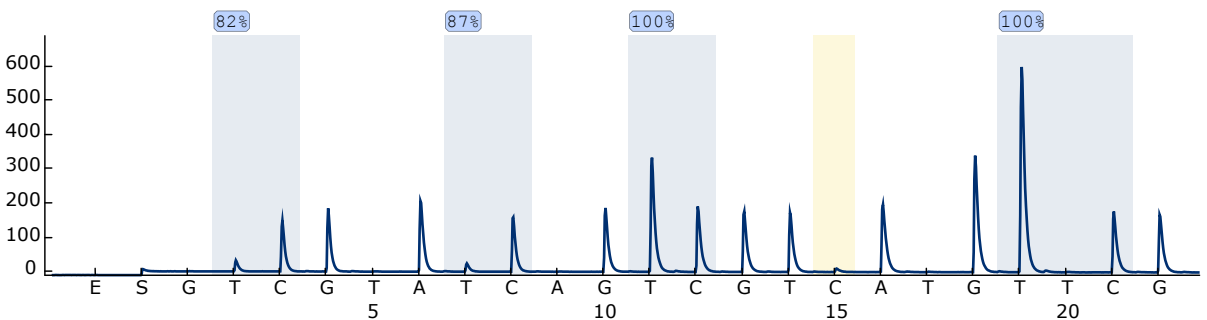


Imagem 7. Curva de pirograma obtida após a análise de ADN convertido de bissulfito altamente metilado (ADN de controlo metilado, fornecido). A barra durante a distribuição 15 representa o controlo para concluir a conversão de bissulfito.

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

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

Comentários e sugestões

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

a) Altura de pico baixa

Eventuais erros de manuseamento na configuração da PCR ou na preparação de amostras antes da piro-sequenciação podem resultar em picos baixos.

É importante que as amostras sejam completamente levadas pela ferramenta de vácuo. 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 um aviso “Check” (Verificada), 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.

Comentários e sugestões

- b) Aparece a mensagem de aviso "Uncertain/Failed bisulfite conversion at dispensation: 15" (Duvidoso/falhou a conversão de bissulfito durante a distribuição: 15)

Certifique-se de que os valores para "Allowed percentage for passed quality" (Percentagem permitida para qualidade aprovada) e "Allowed percentage for check quality" (Percentagem permitida para avaliação da qualidade) estão definidos para 7,0 e 10,0, respectivamente.

Nota: Em caso de uma avaliação de qualidade "Check" (Verificada) ou "Failed" (Falhada), a conversão de bissulfito não foi concluída, o que pode afectar a quantificação de metilação.

Recomenda-se o kit EpiTect Bisulfite (ref.º 59104), o kit EpiTect Plus FFPE Bisulfite (ref.º 59144) ou o kit EpiTect Plus DNA Bisulfite (ref.º 59124) da QIAGEN e seguir rigorosamente o protocolo para a conversão.

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 28. |
| c) Falha da PCR ou da preparação da amostra | Eventuais erros de manuseamento na configuração da PCR, na programação do ciclador de PCR ou na preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação podem resultar em falta de sinais. Efectue o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no <i>Manual de Utilizador do PyroMark Q24</i> e substitua as sondas de filtro quando necessário. Repita a PCR e a análise de piro-sequenciação. |

Controlo de qualidade

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

Limitações

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

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

Características de desempenho

Limite em branco

O limite em branco (LOB, quadro 9) foi determinado para os quatro locais CpG analisados pelo kit *therascreen* MGMT Pyro utilizando amostras de sangue de doadores saudáveis de acordo com as recomendações na directriz EP17-A “Protocolo para a determinação dos limites de detecção e limites de quantificação; directriz aprovada” do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os erros α e β (falso positivo e falso negativo, respectivamente) foram definidos em 5%.

Os valores LOB representam frequências de metilação obtidas de amostras de sangue de dador saudável com uma probabilidade de 95%.

Quadro 9. LOB determinado para locais de metilação específicos utilizando amostras de sangue de doadores saudáveis

Posição	LOB (unidades de %)
Local 1 CpG	1,5
Local 2 CpG	1,8
Local 3 CpG	3,2
Local 4 CpG	3,4
Média de CpG, local 1 a 4	2,1

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

Linearidade

A linearidade foi determinada utilizando misturas de ADN genómico convertido de bissulfite não metilado e metilado do kit EpiTect PCR Control DNA (ref.ª 59104) e, paralelamente, utilizando misturas de plasmídeos que exibem a respectiva sequência convertida de bissulfite de uma amostras não metilada e metilada (ou seja, exibindo nucleótidos C e T nos locais CpG, respectivamente). Os ADN genómicos e plasmídeos, respectivamente, foram misturados em proporções de modo a serem obtidos doze níveis de metilação (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%). Cada mistura foi analisada com três lotes diferentes do kit *therascreen* MGMT Pyro, em três execuções de piro-sequenciação, com três exemplares cada.

Os resultados (n=9 para cada nível de mutação) foram analisados de acordo com a directriz EP6-A do CLSI "Avaliação da linearidade dos procedimentos de medições quantitativas: uma abordagem estatística; directriz aprovada" utilizando o software Analyse-it® v2.21 (Analyse-it Software, Ltd., UK) e estão indicados nas imagens 8 e 9 para a metilação média do local CpG de 1 a 4, utilizando ADN genómico ou plasmídeo como modelo, respectivamente.

Os resultados foram lineares dentro de uma não linearidade permitida de 5 unidades de % no intervalo testado de 0 a 100% de nível de metilação para cada local de metilação individual e para a média dos quatro locais de metilação.

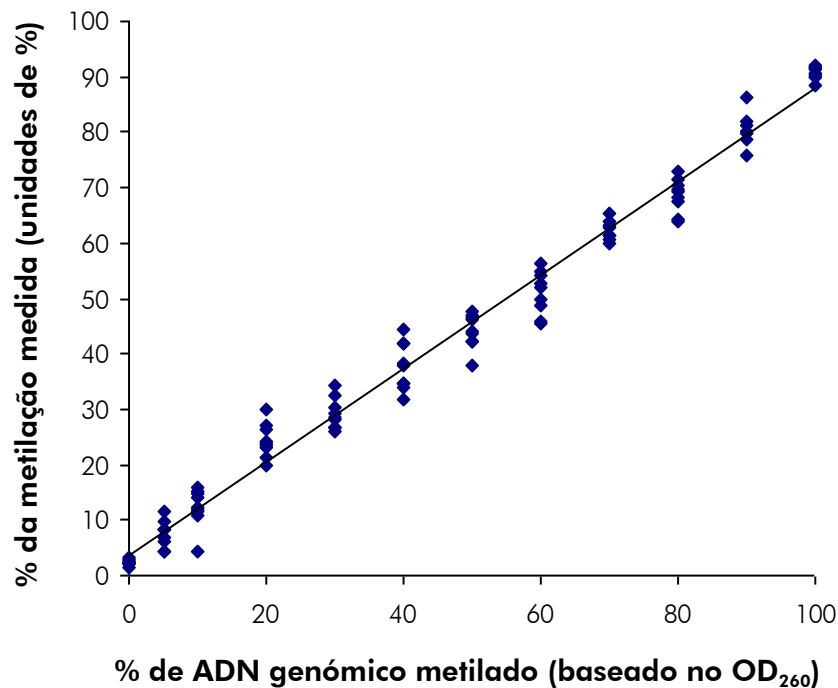


Imagem 8. Linearidade da metilação média do local CpG de 1 a 4, utilizando misturas de ADN de controlo Epitect.

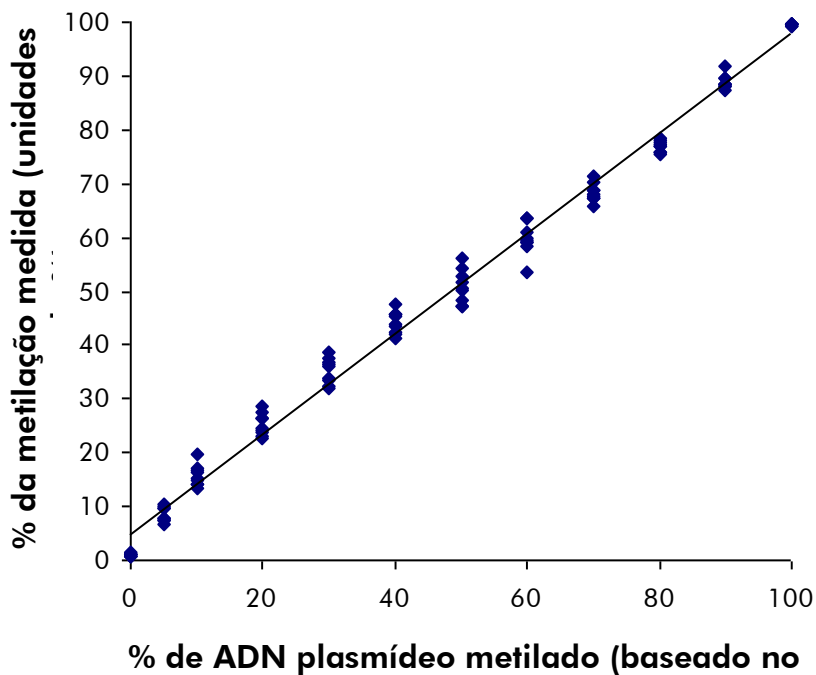


Imagem 9. Linearidade da metilação média do local CpG de 1 a 4, utilizando misturas de ADN plasmídeo.

Precisão

Os dados da precisão permitem a determinação da variação total do ensaio e foram obtidos a três diferentes níveis por análise das misturas de ADN genómico e plasmídeo mencionadas acima, com três exemplares cada.

A repetitividade (variação intra-ensaio e inter-lotes) foi calculada com base nos dados para a determinação da linearidade (3 execuções no mesmo dia, utilizando variados lotes do kit *therascreen* MGMT Pyro). A precisão intermédia (variação intra-laboratorial) foi determinada em 3 execuções, em 1 laboratório, em 3 dias diferentes, com vários operadores, equipamentos PyroMark Q24 e lotes do kit *therascreen* MGMT Pyro. A reprodutibilidade (variação inter-laboratorial) foi calculada com 2 execuções, cada uma em um laboratório interno e um laboratório externo, e utilizando variados lotes do kit *therascreen* MGMT Pyro.

Os cálculos de precisão são expressos como desvio padrão das frequências de metilação média de local de CpG 1 a 4 medidas em unidades de % (quadros 10 e 11). A repetitividade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade utilizando misturas de ADN genómico foram dentro 0,5–4,3, 0,4–4,0 e 0,4–4,4 unidades de %, respectivamente, no intervalo medido de 0–100% de nível de metilação. Obtiveram-se resultados semelhantes utilizando-se misturas de ADN plasmídeo (consulte quadro 11).

Quadro 10. Precisão da metilação média do local CpG de 1 a 4, utilizando misturas de ADN de controlo EpiTect*

% de ADN de controlo metilado EpiTect [†]	Repetitividade		Precisão intermédia		Reprodutibilidade	
	Média	DP [‡]	Média	DP	Média	DP
0	2,4	0,5	2,2	0,4	2,6	0,7
5	7,1	2,7	7,7	2,5	9,3	3,9
10	12,8	2,2	12,9	2,3	15,3	3,3
20	23,7	2,3	23,6	2,2	24,2	2,6
30	29,8	2,6	31,0	2,6	30,4	3,0
40	36,7	3,3	37,0	3,6	38,1	3,7
50	44,1	2,9	44,8	3,6	44,2	2,7
60	51,3	3,6	52,4	3,5	51,2	3,3
70	62,3	1,9	62,8	2,1	61,2	2,9
80	68,6	3,1	69,4	3,1	66,9	3,4
90	80,6	3,3	79,5	2,2	77,0	4,3
100	90,8	1,2	91,7	2,1	90,0	1,9

* Todos os valores são dados em %.

[†] Baseado em medição do OD₂₆₀.

[‡] DP: desvio padrão (n=9 para repetitividade e precisão intermédia, n=12 para reprodutibilidade).

Quadro 11. Precisão da metilação média do local CpG de 1 a 4, utilizando misturas de ADN plasmídeo*

Mistura de ADN plasmídeo (%) [†]	Repetitividade		Precisão intermédia		Reprodutibilidade	
	Média	DP [‡]	Média	DP	Média	DP
0	1,1	0,2	1,0	0,1	1,1	0,3
5	8,6	1,4	8,3	1,1	10,2	3,0
10	15,7	1,9	15,1	2,8	18,8	3,2
20	25,3	2,1	25,5	3,1	28,4	3,6
30	35,2	2,3	34,3	3,2	36,2	2,5
40	44,1	2,0	43,7	3,3	42,8	2,4
50	50,3	3,2	51,8	2,9	52,1	2,5
60	60,2	2,2	60,9	2,8	59,3	2,3
70	68,4	1,7	68,7	1,5	66,9	2,7
80	76,9	1,1	77,4	0,8	75,7	2,1
90	88,9	1,3	88,8	1,7	85,1	4,6
100	99,5	0,1	99,5	0,2	99,0	0,8

* Todos os valores são dados em %.

[†] Baseado em medição do OD₂₆₀. Os valores de 0 a 100% indicam a proporção de plasmídeo que exhibe nucleótidos C nos locais CpG (representando nucleótidos C metilados) numa mistura com plasmídeo que exhibe nucleótidos T nos locais CpG (representando nucleótidos C não metilados).

[‡] DP: desvio padrão (n=9 para repetitividade e precisão intermédia, n=12 para reprodutibilidade).

Avaliação de diagnóstico

O kit *therascreen* MGMT Pyro foi avaliado em comparação com a sequenciação Sanger. O ADN foi extraído de 100 amostras de tumor fixadas em formalina e envolvidas em parafina (FFPE) de glioblastoma e analisado para metilação em quatro locais CpG, analisado pelo kit *therascreen* MGMT Pyro.

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

Das 100 amostras analisadas por sequenciação Sanger, foi possível determinar o estado de metilação em 49 amostras, enquanto que com o kit *therascreen* MGMT Pyro foi possível determinar o nível de metilação em todas as amostras. Os níveis de metilação média entre as unidades de % 1 e 74 foram detectados em 100 amostras por análise de piro-sequenciação (imagem 10). A distribuição dos níveis de metilação para locais individuais é apresentada na imagem 11.

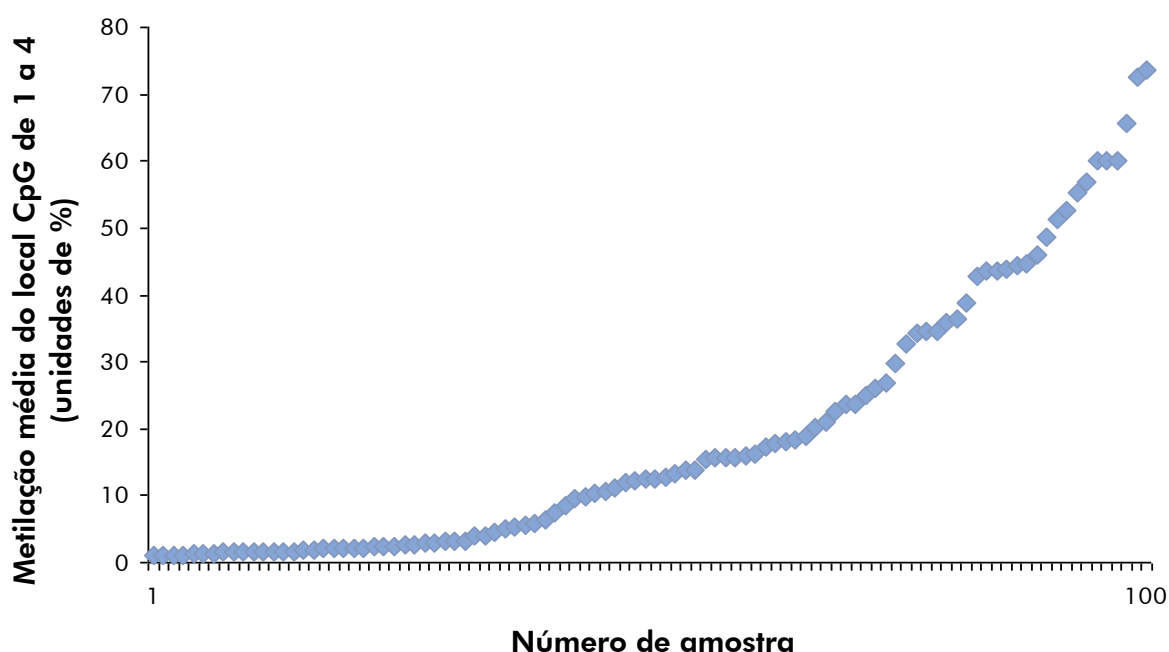


Imagem 10. Metilação média do local CpG de 1 a 4 obtida para 100 amostras de glioblastoma, utilizando o kit *therascreen* MGMT Pyro. As amostras são ordenadas pelo nível de metilação ascendente.

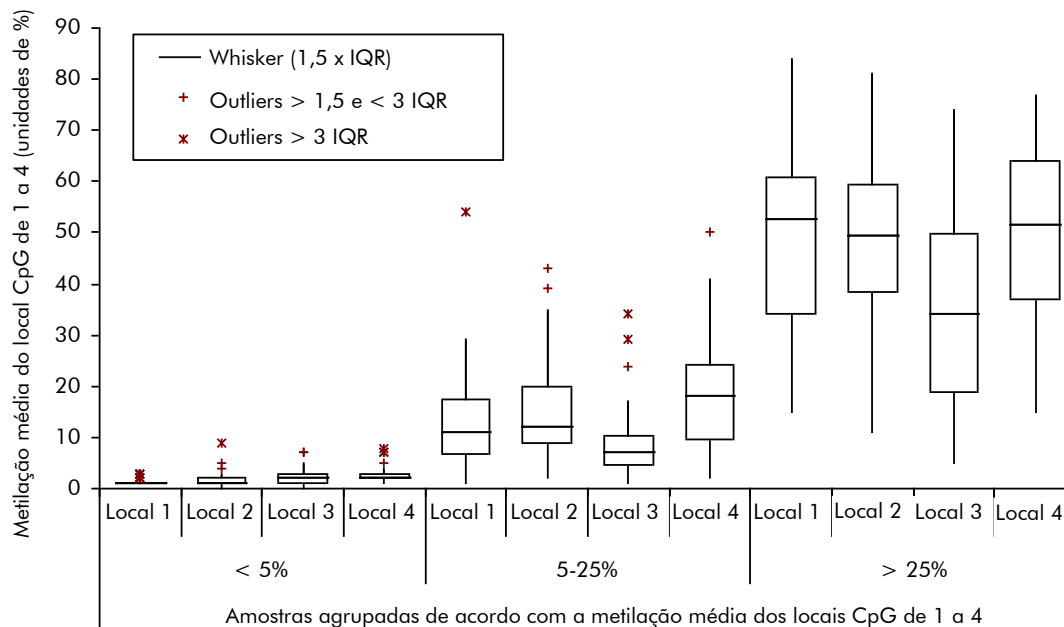


Imagem 11. Distribuição de metilação do local CpG individual em 100 amostras de glioblastoma, utilizando o kit *therascreen* MGMT Pyro. As amostras são agrupadas pela metilação média dos locais CpG de 1 a 4. As caixas representam os quartílicos superior e inferior (25° e 75° percentis) conforme separado pelo número médio (50° percentil, apresentado como linha horizontal). Os dados que estejam fora deste intervalo são apresentados como Whiskers e Outliers, conforme indicado na legenda da caixa dividida. IQR: Intervalo inter-quartilico.

Para a comparação de métodos, foi atribuído um estado não metilado e metilado aos resultados da análise de piro-sequenciação, utilizando 5 unidades de % de metilação média do local CpG de 1 a 4 como cut-off, enquanto que os resultados de sequenciação Sanger foram atribuídos manualmente ao estado não metilado ou metilado.

Foram detectadas trinta e duas amostras como metiladas por sequenciação Sanger. Em todos os casos, foi possível reproduzir o estado de metilação com o kit *therascreen* MGMT Pyro. Duas amostras adicionais foram assinaladas como metiladas por piro-sequenciação, enquanto a metilação não foi detectada para as mesmas por sequenciação Sanger. Das 19 amostras não metiladas detectadas por sequenciação Sanger, o mesmo resultado foi assinalado para 17 amostras, utilizando o kit *therascreen* MGMT Pyro. Os resultados encontram-se ilustrados no quadro 12.

Excluindo as amostras que falharam na análise de sequenciação Sanger, o kit *therascreen* MGMT Pyro e a sequenciação Sanger mostraram uma concordância de 96% nos resultados (quadro 12).

Quadro 12. Resultados da análise metilada no local CpG de 1 a 4 para as amostras de glioblastoma analisadas

Kit theascreen MGMT Pyro		Sequenciação Sanger			
		Não metilado	Metilado	Desconhecido	Total
Não metilado		17	0	18	35
Metilado		2	32	31	65
Desconhecido		0	0	0	0
Total		19	32	49	100










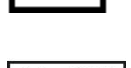
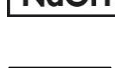
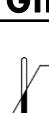


Nota: Em todas as execuções utilizadas para a determinação das características de desempenho, o sinal era superior a 30 RLU, conforme obtidos rotineiramente de 10 ng de ADN isolado de sangue (medido antes da conversão de bissulfito).

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

	Contém reagentes suficientes para <N> testes
	Prazo de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Ref.º
	Número de lote
	Número do material
	Componentes
	Conteúdo
	Número
	Hidróxido de sódio
	Número do item de comércio mundial
	Limitação de temperatura
	Fabricante
	Consultar instruções de utilização



Informações de contacto

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

Anexo A: Preparação do ensaio MGMT

Antes de executar o ensaio MGMT pela primeira vez, é necessário configurar o ficheiro do ensaio. Prepare o ensaio MGMT utilizando o software PyroMark Q24, conforme descrito em baixo.

Procedimento

1. Clique em  na barra de ferramentas e seleccione “New CpG Assay” (Novo ensaio CpG).
2. Digite a sequência em “Sequence to Analyze” (Sequência a analisar):
YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT
3. Introduza manualmente o “Dispensation Order” (Pedido de distribuição) seguinte:
GTCGTATCAGTCGTCATGTTCCG
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. No separador “Analysis Parameters” (Parâmetros de análise), defina “Allowed percentage for passed quality” (Percentagem permitida para qualidade aprovada) e “Allowed percentage for check quality” (Percentagem permitida para avaliação da qualidade) para 7,0 e 10,0, respectivamente.
6. Clique em  na barra de ferramentas e guarde o ensaio como “MGMT”.

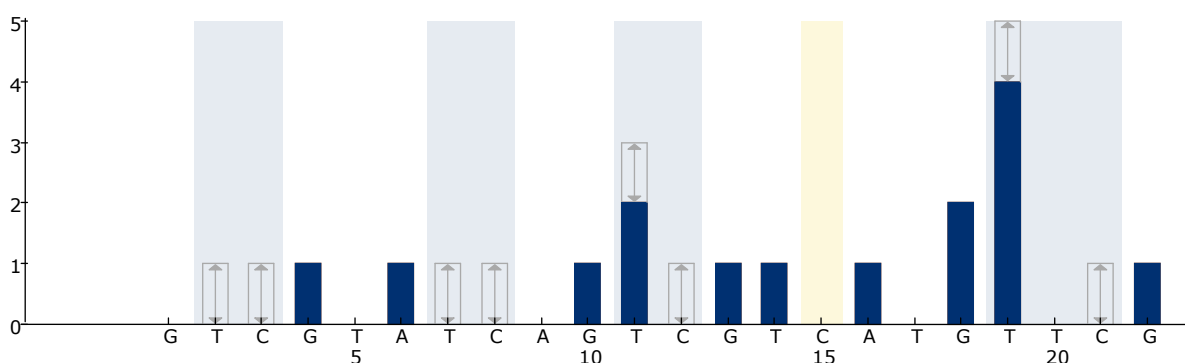



Imagem 12. Histograma para o ensaio MGMT. A barra durante a distribuição 15 indica o controlo para concluir a conversão de bissulfito.

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.**
- B5. A tampa pode ser retirada sem retirar a tubagem.**

B6. 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.ª
<i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit (48)	Para 48 reacções nos sistemas PyroMark Q24: Iniciadores de Seq, iniciadores de PCR, ADN de controlo metilado, mistura principal de PCR PyroMark, concentrado CoralLoad, tampão de ligação PyroMark, tampão de "annealing" PyroMark, solução de desnaturação PyroMark, tampão de lavagem PyroMark, mistura de enzimas, mistura de substrato, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP, e H ₂ O	971061
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
EpiTect Bisulfite Kit	Para 48 preparações: colunas de rotação de bissulfito, mistura de reacção, tampão de protecção de ADN, ARN transportador, tampões do EpiTect	59104

* Apenas no Reino Unido.

† Restantes países.

Produto	Conteúdo	Ref.º
EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit	Para 48 preparações: colunas de rotação de ADN, mistura de bissulfito, tampão de protecção de ADN, ARN transportador, tampões, solução de desparafinização, tampão de lise FTB do MinElute	59144
EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit	Para 48 preparações: colunas de rotação de ADN, mistura de bissulfito, tampão de protecção de ADN, ARN transportador, tampões	59124
EpiTect PCR Control DNA Set (100)	Kit de ADN de controlo humano (contém ADN convertido de bissulfito metilado e não metilado e ADN não convertido não metilado) para 100 PCRs de controlo	59695

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.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Marcas registadas: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EpiTect®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ABI™ (Life Technologies); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd., UK); 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* MGMT Pyro dos seguintes termos:

1. O kit *therascreen* MGMT Pyro pode ser usado unicamente de acordo com o *Manual do kit* *therascreen* MGMT 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* MGMT 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.

© 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)

