

Marzo de 2015

# Manual del kit *therascreen*<sup>®</sup> EGFR Pyro<sup>®</sup> 24

Versión 1



Para uso en diagnóstico *in vitro*



971480



1061827ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

ALEMANIA

R3

MAT

1061827ES



Sample & Assay Technologies

# **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 sienta precedentes 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](http://www.qiagen.com).

# Contenido

<b>Uso previsto</b>	<b>5</b>
<b>Resumen y explicación</b>	<b>5</b>
<b>Principio del procedimiento</b>	<b>6</b>
<b>Materiales suministrados</b>	<b>9</b>
Contenido del kit	9
<b>Materiales requeridos pero no suministrados</b>	<b>11</b>
<b>Advertencias y precauciones</b>	<b>12</b>
Información de seguridad	12
Precauciones generales	13
<b>Almacenamiento y manipulación de reactivos</b>	<b>14</b>
<b>Manipulación y almacenamiento de muestras</b>	<b>15</b>
<b>Procedimiento</b>	<b>16</b>
Aislamiento de ADN	16
Protocolo	
■ 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24	17
■ 2: Ejecución de la PCR con los reactivos para PCR suministrados con el kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro	21
■ 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance	24
■ 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24	26
■ 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24.	31
■ 6: Serie analítica en el PyroMark Q24	34
<b>Interpretación de los resultados</b>	<b>38</b>
Interpretación de los resultados del análisis y detección de mutaciones de bajo nivel	38
Guía de resolución de problemas	44
<b>Control de calidad</b>	<b>48</b>
<b>Limitaciones</b>	<b>48</b>
<b>Características de rendimiento</b>	<b>49</b>
Límite de blanco y límite de detección	49
Linealidad	52

Precisión	53
Evaluación diagnóstica	53
<b>Referencias</b>	<b>58</b>
<b>Símbolos</b>	<b>59</b>
<b>Información de contacto</b>	<b>59</b>
<b>Apéndice A: configuración de los ensayos <i>therascreen</i> EGFR Pyro</b>	<b>60</b>
<b>Apéndice B: vaciado del contenedor de residuos y los contenedores</b>	<b>65</b>
<b>Información para pedidos</b>	<b>67</b>

## Uso previsto

El kit *therascreen* EGFR Pyro es una prueba de detección *in vitro* de secuencias de ácidos nucleicos que utiliza la tecnología de pirosecuenciación Pyrosequencing® para la detección cuantitativa de mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen humano EGFR en ADN genómico obtenido de muestras de tejido humano.

El kit *therascreen* EGFR Pyro se ha diseñado para que los médicos dispongan de información que les ayude a seleccionar los pacientes con cáncer que tienen más probabilidades de beneficiarse de un tratamiento con terapias por inhibición del EGFR. 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.

## Resumen y explicación

El kit *therascreen* EGFR Pyro permite la medición cuantitativa de las mutaciones de los codones 719, 768, 790 y 858–861, así como de las deleciones y mutaciones complejas del exón 19 en el gen EGFR humano.

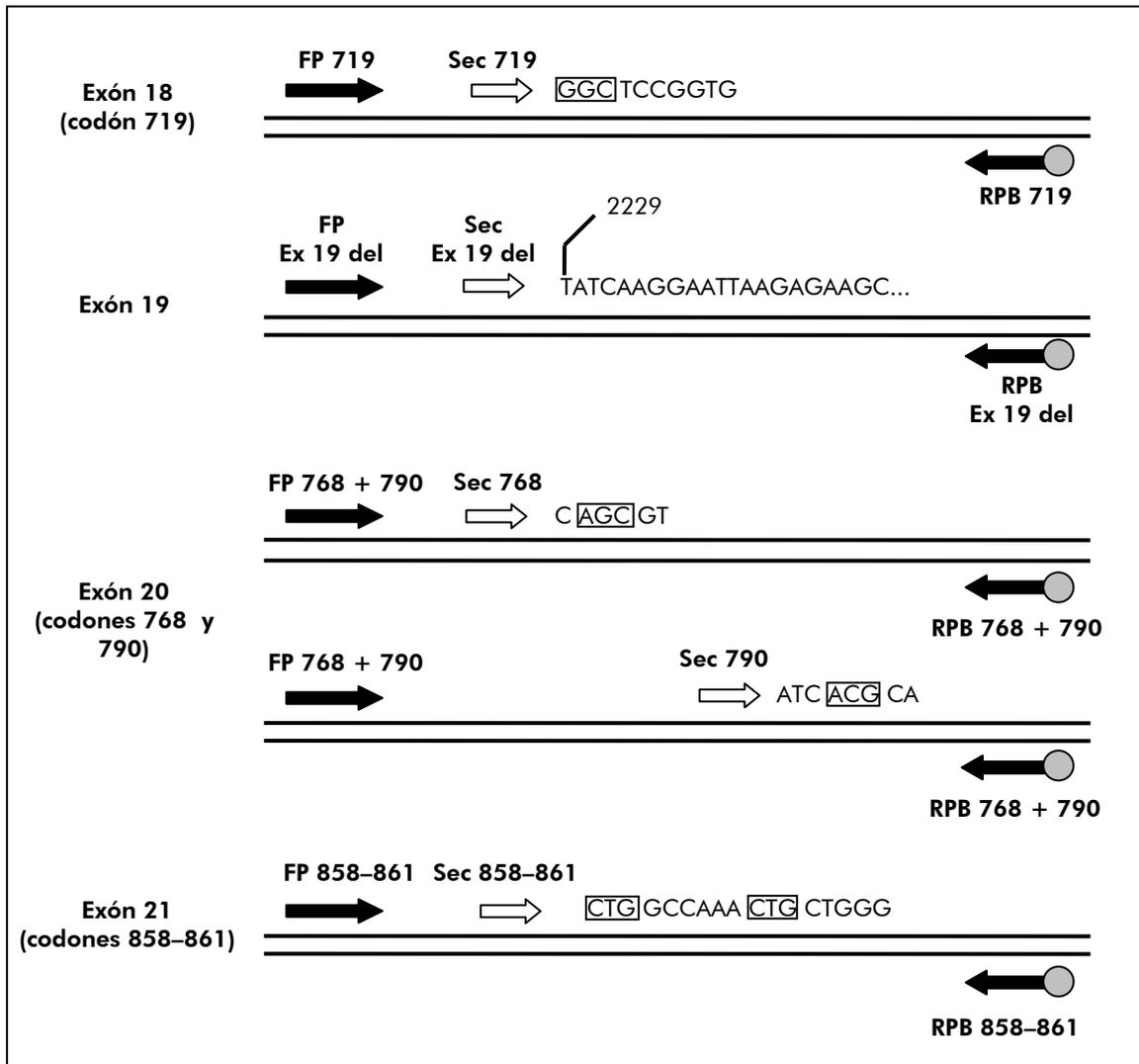
El kit consta de cuatro ensayos de PCR (ilustración 1) para la detección de:

- Mutaciones en el codón 719 (exón 18)
- Mutaciones en los codones 768 y 790 (exón 20)
- Mutaciones en los codones 858 a 861 (exón 21)
- Deleciones y mutaciones complejas en el exón 19

Las cuatro regiones se amplifican por separado mediante la técnica de PCR y posteriormente se procede a la secuenciación de la región definida. El amplicón que actúa en los codones 768 y 790 se divide en dos reacciones de secuenciación. 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.

Todos los ensayos se someten a secuenciación directa.

El producto incluye una mezcla de cebadores de PCR y cebadores de secuenciación para cada ensayo. Los cebadores se suministran en forma de solución. Cada vial contiene 24 µl de cada cebador o mezcla de cebadores.



**Ilustración 1. Ilustración del ensayo de EGFR.** La secuencia indicada corresponde a la secuencia analizada de una muestra nativa. **FP:** cebadores de PCR directos; **RPB:** cebadores de PCR inversos (B indica biotilación); **Sec:** cebadores de secuenciación.

## Principio del procedimiento

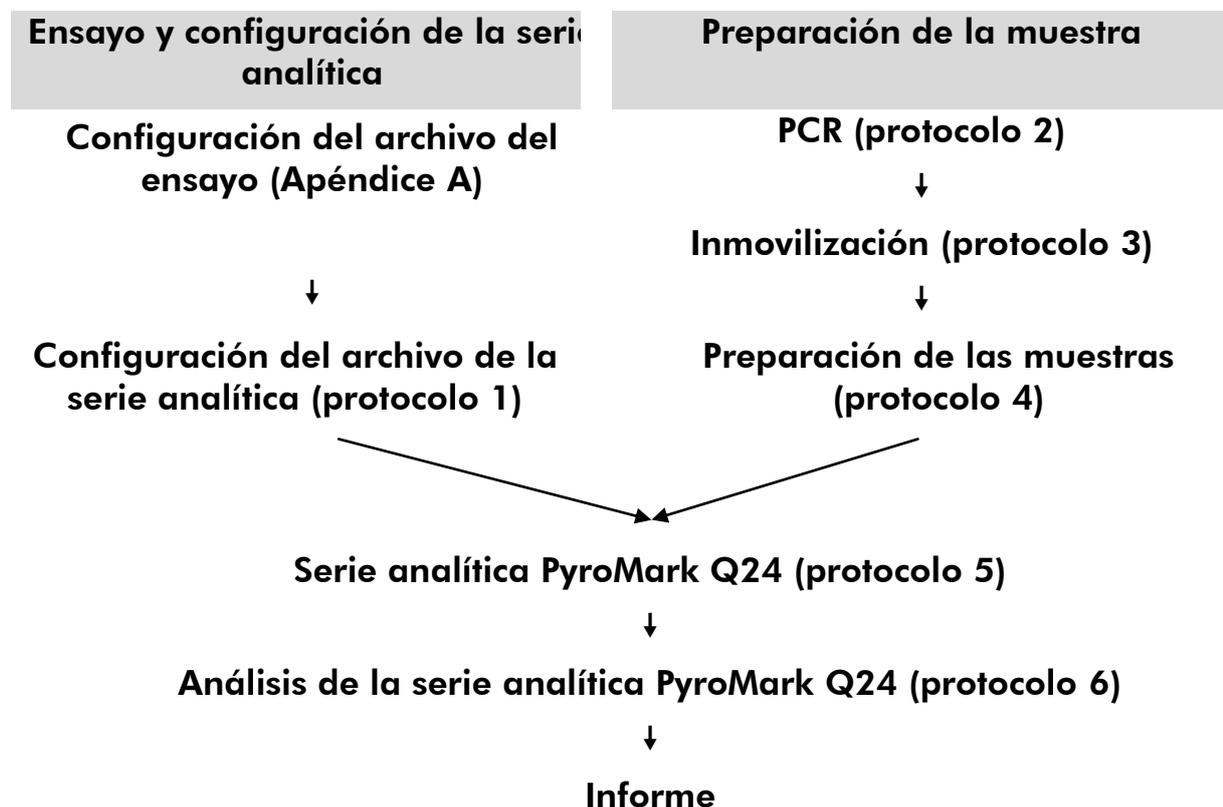
El diagrama incluido a continuación ilustra la ejecución del ensayo. Después de realizar la PCR con cebadores dirigidos a los exones 18, 19, 20 y 21, se inmovilizan los amplicones con las microesferas Streptavidin Sepharose® High Performance beads. A continuación, se prepara el ADN monocatenario y luego se hibridan los cebadores de secuenciación correspondientes con el ADN. Las muestras se analizan en el sistema PyroMark Q24 utilizando un archivo de configuración de la serie analítica y un archivo para la serie analítica.

Se recomienda utilizar el EGFR Plug-in Report para analizar la serie analítica. Puede obtener el EGFR Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección [pyro.plugin@qiagen.com](mailto: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 para analizar) se puede ajustar a fin de detectar las distintas deleciones del exón 19 y las mutaciones raras de los otros exones una vez realizado el ensayo (consulte el apartado "Protocolo 6: serie analítica en el PyroMark Q24" en la página 34).

**Nota:** se ha modificado ligeramente el proceso de trabajo indicado en la revisión R1 del *Manual de uso del kit theascreen EGFR Pyro* (véase "Protocolo 4: preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24", página 26).

### Proceso de trabajo con el kit *therascreen* EGFR 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 el apartado "Interpretación de los

resultados”, página 38). 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* EGFR Pyro (caja 1/2)

<b>Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro</b>	<b>(24)</b>
<b>Referencia</b>	<b>971480</b>
<b>Número de reacciones</b>	<b>24</b>
Cebador de secuenciación EGFR 719	24 µl
Cebador de secuenciación EGFR Ex 19 Del	24 µl
Cebador de secuenciación EGFR 768	24 µl
Cebador de secuenciación EGFR 790	24 µl
Cebador de secuenciación EGFR 858–861	24 µl
Cebador de PCR EGFR 719	24 µl
Cebador de PCR EGFR Ex19 Del	24 µl
Cebador de PCR EGFR 768+790	24 µl
Cebador de PCR EGFR 858–861	24 µl
Mezcla maestra PyroMark PCR, 2x	2 x 850 µl
Concentrado CoralLoad®, 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	5 x 1,9 ml
ADN de control no metilado, 10 ng/µl	100 µl

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

<b>Tampones y reactivos <i>therascreen</i></b>		
Tampón de unión PyroMark		2 x 10 ml
Tampón de <i>annealing</i> PyroMark		2 x 10 ml
Solución de desnaturalización PyroMark*		2 x 250 ml
Tampón de lavado PyroMark, 10x		2 x 25 ml
Mezcla de enzimas		2 viales
Mezcla de sustratos		2 viales
dATP $\alpha$ S		2 x 1180 $\mu$ l
dCTP		2 x 1180 $\mu$ l
dGTP		2 x 1180 $\mu$ l
dTTP		2 x 1180 $\mu$ l
Manual		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 la seguridad de los materiales (SDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

- Aislamiento de ADN (véase “Aislamiento de ADN”, página 16)
- Pipetas (ajustables)\*
- Puntas de pipeta estériles (con filtros para la preparación de la PCR)
- Microcentrífuga de mesa\*
- Termociclador\* y tubos para PCR adecuados
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n.º de referencia 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (n.º de referencia 9001513 ó 9001514)\*†
- Software PyroMark Q24 (n.º de referencia 9019063 ó 9019062)†
- Placa PyroMark Q24 (n.º de referencia 979301)†
- Cartucho PyroMark Q24 (n.º de referencia 979302)†
- Estación de vacío PyroMark Q24 (n.º de referencia 9001515 ó 9001517)\*†
- Bloque térmico\* capaz de alcanzar 80 °C
- Placa de PCR de 24 pocillos o tiras
- Tapas de tiras
- Agua ultrapura (Milli-Q® 18,2 MΩ 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%)‡

\* Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

† Mercado 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.

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

## Mezcladores de placas recomendados

Los mezcladores de placas incluidos en la tabla 1 están recomendados para el uso combinado con el kit *therascreen* EGFR Pyro.

**Tabla 1. Mezcladores de placas recomendados para el uso combinado con el kit *therascreen* EGFR Pyro.**

Fabricante	Producto	Referencia
Eppendorf	Thermomixer comfort (dispositivo básico)	5355 000.011
	Termobloque para placas de microtítulo	5363 000.012
	Placa adaptadora para tubos de PCR de 96 x 0,2ml para introducir en los bloques para placas de microtítulo	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 la seguridad de los materiales (SDS). Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos MSDS 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* EGFR 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.

### PyroMark Enzyme Mixture



Contiene: (R\*,R\*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Peligro! Provoca irritación cutánea. Provoca lesiones oculares graves. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. SI SE EXPUSO o está afectado: Llame a un CENTRO DEVENENOS o a un médico. Quítese la ropa contaminada y lávela antes de volver a usarla. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

### PyroMark Substrate Mixture



Contiene: acetic acid. Atención! Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. Quítese la ropa contaminada y lávela antes de volver a usarla. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

## Precauciones generales

**Nota:** 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.
- Se ha modificado ligeramente el proceso de trabajo indicado en la revisión R1 del *Manual de uso del kit theascreen EGFR Pyro* (véase "Protocolo 4: preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24", página 26).

- 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 centrifúgelos brevemente.
- Los resultados erróneos no deben tenerse en cuenta para determinar el estado de la mutación.

## Almacenamiento y manipulación de reactivos

El kit *therascreen* EGFR Pyro se envía en dos cajas. El kit *therascreen* EGFR 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 cebadores deben conservarse a una temperatura comprendida entre –30 y –15 °C tras su recepción.

Los tampones y reactivos *therascreen* (caja 2/2) que contienen tampones, mezcla de enzimas, mezcla de sustratos, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP y dTTP (los reactivos para el análisis de pirosecuenciación [Pyrosequencing<sup>®</sup>]) 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 –30 a –15 °C. Los reactivos congelados no deben someterse a más de 3 ciclos de congelación–descongelación.

**Nota:** no deben congelarse los nucleótidos.

El kit *therascreen* EGFR 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.

Se recomienda utilizar los kits QIAGEN® indicados en la tabla 2 para la purificación del ADN de los tipos de muestras humanas especificados para uso con el kit *therascreen* EGFR Pyro. Lleve a cabo la purificación del ADN según las instrucciones de los manuales de cada kit.

**Tabla 2. Kits de purificación del ADN recomendados para el uso con el kit *therascreen* EGFR Pyro.**

Material de las muestras	Kit de aislamiento de ácidos nucleicos	Número de referencia (QIAGEN)
Tejido impregnado en parafina	Kit QIAamp DNA FFPE Tissue (50)	56404
	Kit EZ1 DNA Tissue (48)*	953034
Sangre	Kit QIAamp DSP DNA Blood Mini†	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 el EGFR Plug-in Report, cree una configuración de ensayo (consulte el Apéndice A en la página 60). Este paso debe realizarse solamente una vez antes de ejecutar el ensayo *therascreen* EGFR Pyro por primera vez. Si se ha instalado EGFR Plugin Report, encontrará las configuraciones de ensayo predefinidas en el navegador de accesos directos del software PyroMark Q24, en la ruta “Example Files/PyroMark Setups/EGFR”. Puede obtener el EGFR Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

## Procedimiento

- 1. Haga clic  en la barra de herramientas.**  
Se creará un nuevo archivo de serie analítica.
- 2. Introduzca los parámetros de la serie (véase “Parámetros de la serie analítica”, página 19).**
- 3. Configure la placa. Para ello, añada los ensayos para las 5 reacciones de secuenciación distintas en los pocillos correspondientes a las muestras para 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 (véase “Controles”, página 12).
- 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®.**

**Nota:** la información previa de la serie impresa puede servir como plantilla para la configuración de la muestra (véase “Protocolo 3: inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance”, página 24).

Para realizar la serie analítica de la placa en un sistema PyroMark Q24, consulte el apartado “Protocolo 5: funcionamiento del sistema PyroMark Q24.”, página 31.

## 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):	<b>Opcional:</b> introduzca el identificador de la placa PyroMark Q24.
“Bar code” (código de barras):	<b>Opcional:</b> 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):	<b>Opcional:</b> introduzca el número de lote del kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro que se va a utilizar. El número de lote se halla en la etiqueta del producto. <b>Nota:</b> se recomienda introducir tanto el identificador del reactivo como el del kit a fin de poder realizar un seguimiento de posibles problemas que puedan surgir con los reactivos.
“Run note” (Nota de la serie analítica):	<b>Opcional:</b> 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* EGFR Pyro

Este protocolo se ha diseñado para 4 amplificaciones mediante PCR distintas de las regiones que contienen el codón 719 (exón 18), los codones 768 y 790 (exón 20), los codones 858–861 (exón 21) o las deleciones y mutaciones complejas del exón 19 utilizando los cebadores de pirosecuenciación *therascreen* EGFR Pyro.

### Cuestiones importantes antes de comenzar

- La enzima HotStarTaq® ADN polimerasa de la mezcla maestra 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 ADN 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 cebadores para PCR, centrifúguelos brevemente para depositar el contenido en el fondo de los tubos.
- Ajuste la concentración del ADN de control y de muestra a 0,4–2 ng/μl si es necesario.

### Procedimiento

#### 1. Descongele todos los componentes necesarios (consulte la tabla 3).

Mézclelos bien antes de utilizarlos.

#### 2. Prepare una mezcla de reacción para cada conjunto de cebadores para PCR según los datos de la tabla 3.

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 3. Preparación de la mezcla de reacción para cada mezcla de cebadores para PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volumen/reacción (µl)</b>
Mezcla maestra PyroMark PCR, 2x	12,5
Concentrado CoralLoad, 10x	2,5
Cebador de PCR EGFR 719	
• cebador de PCR EGFR Ex 19 Del	
• cebador de PCR EGFR 768 y 790	1,0
• cebador de PCR EGFR 858–861	
Agua (H <sub>2</sub> O, suministrada)	4,0
<b>Volumen total</b>	<b>20,0</b>

**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 (consulte la tabla 4) 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 (véase “Controles”, página 7).

**Tabla 4. Preparación de la PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volumen/reacción (µl)</b>
Mezcla de reacción	20
ADN de muestra	5
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>

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

**Tabla 5. Protocolo de ciclado optimizado**

			<b>Comentarios</b>
<b>Paso de activación inicial:</b>	15 minutos	95 °C	La enzima HotStarTaq ADN polimerasa se activa con este paso de calentamiento.
<b>Ciclado en 3 pasos:</b>			
Desnaturalización	20 segundos	95 °C	
<i>Annealing</i>	30 segundos	53 °C	
Extensión	20 segundos	72 °C	
Número de ciclos	42		
<b>Extensión final:</b>	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, prosiga con el "Protocolo 3: inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance", página 24.**

## 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.

### 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 6. Prepare un 10% de volumen más del necesario para el número total de reacciones que se vayan a realizar.**

**Tabla 6. Mezcla maestra para inmovilización de ADN**

<b>Componente</b>	<b>Volumen/muestra (µl)</b>
Streptavidin Sepharose High Performance	2
Tampón de unión PyroMark	40
Agua (H <sub>2</sub> O, suministrada)	28
<b>Volumen total</b>	<b>70</b>

3. **Añada 70 µl de mezcla maestra a los pocillos de la placa de PCR de 24 pocillos o a las tiras, según se haya definido en la configuración de la serie analítica (consulte el apartado “Protocolo 1: configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24”, página 17).**
4. **Añada 10 µl 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 el apartado “Protocolo 1: configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24”, página 17).**

**Nota:** el volumen total por pocillo debería ser de 80  $\mu$ l tras la adición de la mezcla maestra y el producto de PCR.

**5. Cierre herméticamente la placa de PCR (o tiras) con las tapas de tiras.**

**Nota:** 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.**

**Nota:** durante la ejecución de este paso, 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 del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).

**7. Proceda inmediatamente con el "Protocolo 4: preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24", página 26.**

**Nota:** 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 (o las tiras), vuelva a agitarla durante 1 minuto antes de capturar las microesferas.

## 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 el annealing del cebador 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 cebadores de secuenciación, centrifúguelos brevemente para depositar el contenido en el fondo de los tubos.
- Añada los 5 cebadores de secuenciación distintos al mismo patrón tal como se ha definido previamente para la placa durante la configuración de la serie analítica (consulte el apartado “Protocolo 1: configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24” en la página 17), según la región para analizar (codón 719 [exón 18], codones 768 y 790 [exón 20], codones 858–861 [exón 21] o exón 19).
- Se ha modificado ligeramente el proceso de trabajo indicado en la revisión R1 del *Manual de uso del kit theascreen EGFR Pyro* (paso 18). 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 el manual de usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*) y sustitúyalas según se indique.

### Antes de comenzar

- Introduzca un soporte para placas PyroMark Q24 en un bloque térmico precalentado a 80 °C para su uso en el paso 17. Mantenga un segundo soporte para placas PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15–25 °C) para utilizarlo en el paso 18.
- 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.

### Procedimiento

1. **Diluya un volumen suficiente de cada cebador de secuenciación (cebador de secuenciación EGFR 719, cebador de secuenciación EGFR 768, cebador de secuenciación EGFR 790, cebador de**

**secuenciación EGFR 858–861 y cebador de secuenciación EGFR Exon 19 Del) en el tampón de hibridación PyroMark tal y como se indica en la tabla 7.**

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

**Tabla 7. Ejemplo de dilución para cebadores de secuenciación**

<b>Componente</b>	<b>Volumen/muestra (µl)</b>	<b>Volumen para 9 + 1 reacciones (µl)</b>
Cebador de secuenciación EGFR 719		
• cebador de secuenciación EGFR Ex 19 Del		
• cebador de secuenciación EGFR 768 y 790	0,8	8
• cebador de secuenciación EGFR 858–861		
Tampón de <i>annealing</i> PyroMark	24,2	242
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

- Añada 25 µl del cebador de secuenciación diluido a cada pocillo de la placa PyroMark Q24 de acuerdo con la configuración de la serie analítica (consulte el apartado “Protocolo 1: configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24”, página 17).**

**Nota:** 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.

- Coloque la placa de PCR (o las tiras) del protocolo 3 y la placa PyroMark Q24 en la tabla de trabajo (ilustración 2).**

**Nota:** asegúrese de cargar la placa con la misma orientación en la que se han cargado las muestras.



**Ilustración 2.** Colocación de la placa de PCR (o tiras) y de la placa PyroMark Q24 plate en la estación de vacío.

4. Conecte el interruptor de vacío para aplicar vacío a la herramienta.
5. Introduzca con cuidado las sondas de filtro de la herramienta de vacío en la placa de PCR (o tiras) 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.

**Nota:** 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 (o las tiras), vuelva a agitarla durante 1 minuto antes de capturar las microesferas.

6. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 40 ml de etanol al 70% (ilustración 2). Aclare las sondas de filtros durante 5 segundos.
7. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 40 ml de solución de desnaturalización (ilustración 2). Aclare las sondas de filtros durante 5 segundos.
8. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 50 ml de tampón de lavado (ilustración 2). Aclare las sondas de filtros durante 10 segundos.
9. 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 3).



**Ilustración 3.** Ilustración de la herramienta de vacío levantada en vertical más de 90°.

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

**Nota:** extreme la precaución para no dañar la superficie de la placa PyroMark Q24 arañándola con las sondas de filtro.
- 12. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor de agua ultrapura (ilustración 2) y agítela durante 10 segundos.**
- 13. Introduzca las sondas en el agua ultrapura (Ilustración 2) y aplique el vacío para lavar las sondas de filtros. Aclare las sondas con 70 ml de agua ultrapura.**
- 14. 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 3).**
- 15. Desconecte el interruptor de vacío de la herramienta (Off) y colóquela en la posición de reposo [Parking (P)].**
- 16. Desconecte la bomba de vacío.**

**Nota:** 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 el Apéndice B, página 65).
- 17. Caliente la placa PyroMark Q24 con las muestras a 80 °C durante 2 minutos mediante el soporte para placas precalentado PyroMark Q24.**
- 18. 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.

19. Proceda con el "Protocolo 5: funcionamiento del sistema PyroMark Q24.", página 31.

## 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 del 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 el apartado "Protocolo 1: configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", página 17), incluye información sobre el volumen de los nucleótidos, las enzimas y los tampones de sustratos necesarios para cada serie.

### Antes de comenzar

- Encienda el sistema PyroMark Q24. El botón de encendido se halla en la parte posterior del equipo.

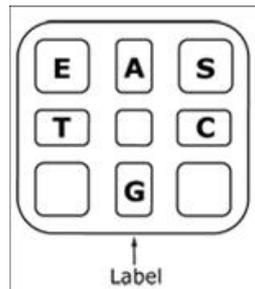
### Procedimiento

- 1. Disuelva las mezclas de enzimas y sustratos congeladas y secadas en 620  $\mu$ l de agua cada una ( $H_2O$ , suministrada).**
- 2. Agite suavemente el vial para mezclar bien el contenido.**  
**Nota:** no lo agite mediante vórtice!  
**Nota:** 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.**

\* 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 la seguridad de los materiales (SDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

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 4.**

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



**Ilustración 4. 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.**  
Nota: no desconecte la unidad USB hasta que finalice la serie analítica.
11. **Seleccione "Run" en el menú principal (mediante los botones ▲ y ▼ de la pantalla) y luego pulse "OK".**
12. **Seleccione el archivo de la serie analítica mediante los botones ▲ y ▼ de la pantalla.**  
**Nota:** 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 estire).**
- 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 el "Protocolo 6: serie analítica en el PyroMark Q24", página 34.**

## Protocolo 6: serie analítica en el PyroMark Q24

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

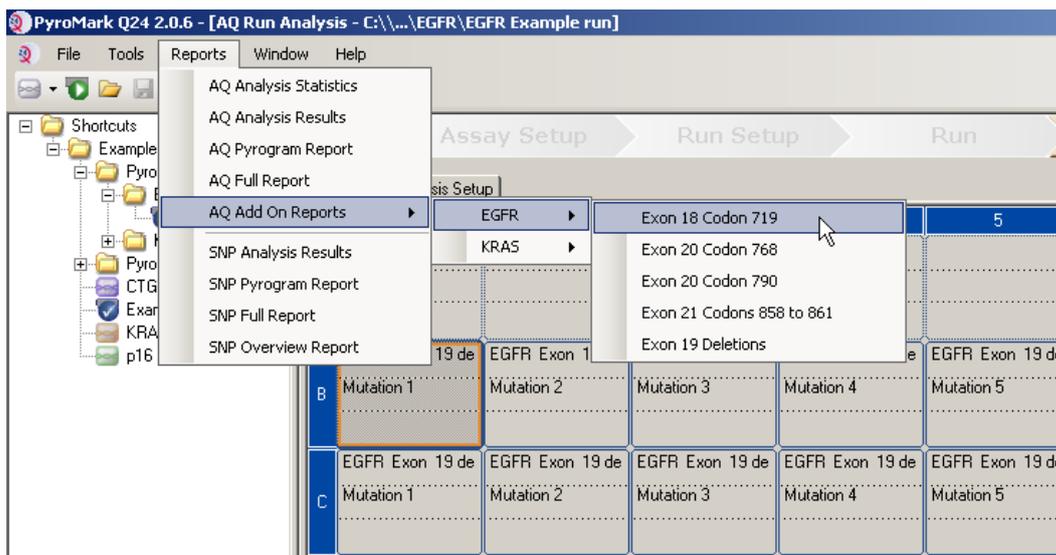
### Procedimiento

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 el EGFR Plug-in Report, vaya al paso 5. Si utiliza el análisis AQ incluido en el sistema PyroMark Q24, vaya al paso 6.

**Nota:** se recomienda utilizar EGFR Plug-in Report para la interpretación de los resultados. Puede obtener el EGFR Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). Este informe es una garantía de que se van a utilizar los valores de LOD y los diferentes valores de "Sequences to Analyze" (secuencia para analizar) correspondientes para detectar todas las mutaciones y deleciones, incluida la identificación de veinte deleciones y mutaciones complejas distintas en el exón 19.

### 5. Si utiliza EGFR Plug-in Report:

Seleccione las opciones "AQ Add On Reports/EGFR" (añadir AQ en informes/EGFR) y "Exon 18 Codon 719" (exón 18 codón 719), "Exon 19 Deletions" (deleciones del exón 19) o "Exon 20 Codon 768" (exón 20 codón 768) o "Exon 20 Codon 790" (exón 20 codón 790) o "Exon 21 Codons 858 to 961" (exón 21 codones 858 a 961) en el menú "Reports" (informes) (consulte la Ilustración 5).



**Ilustración 5. Pantalla de análisis de la serie AQ**

Se analizan automáticamente todos los pocillos para detectar todas las mutaciones cuyos valores LOD se indican en la tabla 8. Los resultados se presentan en una tabla de resumen (ilustración 6), además de resultados detallados que incluyen, por ejemplo, pirogramas y análisis de calidad.

## Summary

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Amino Acid Substitution	Info
A1	B104683	Mutation	34.0	del E746-A750	
A2	B105072	Wildtype			
A3	B116390	Mutation	26.6	delL747-P753insS	
A4	B116389	Wildtype			
A5	B116301	Potential low level mutation	3.2	delK745-E749	⚠
A6	B116392	Mutation	15.4	del E746-A750	
A7	WT control	Wildtype			
A8	NTC	Failed Analysis			⚠

⚠ See detailed results for further explanation.

NOTE: For further information about data evaluation please refer to the handbook.

**Ilustración 6. Tabla de resultados resumidos**

## 6. Si utiliza el análisis AQ:

**Para analizar el ensayo EGFR 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 de Pyrogram<sup>®</sup>. Si desea obtener una descripción detallada sobre cómo realizar una serie analítica, consulte el manual del usuario del 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: El valor estándar de “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar), tal como se ha definido en la configuración del análisis, cubre las mutaciones más frecuentes de los codones 719, 768, 790, 858 y 861 y la deleción más frecuente del exón 19 (consulte el Apéndice A en la página 60), Si una muestra contiene una mutación menos frecuente, puede modificarse el valor de “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar) para que se analice también el estado de la mutación en dicha posición, como se describe en el Apéndice A.

Las frecuencias actualizadas de las mutaciones en el gen EGFR humano se pueden descargar en línea desde el sitio Web del Instituto Sanger: [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

**Nota:** se recomienda utilizar alturas de pico individual superiores a 20 RLU para el ensayo del codón 768 y a 30 RLU para los restantes cuatro ensayos a fin de obtener unos resultados fiables. Defina el valor “required peak height for passed quality” (altura de pico necesaria para calidad garantizada) en 20 ó 30 RLU respectivamente durante la configuración del ensayo (consulte el manual del usuario del PyroMark Q24 [PyroMark Q24 User Manual] el Apéndice A).

**Nota:** para permitir una cuantificación correcta para el codón 719 y el codón 790, ajuste las alturas de las barras del histograma durante la configuración del ensayo (consulte el Apéndice A en la página 60).

**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 al 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 para analizar) o cuyas valoraciones de calidad han obtenido los valores “Check” (revisar) o “Failed” (errónea).**

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 en otra posición que dé 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 para 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).

**Nota:** después de modificar el valor de “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar), compruebe que se hayan ajustado correctamente el umbral para la altura de pico único y la altura de las barras del histograma (consulte el Apéndice A en la página 60).

**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).

Deben examinarse todas las muestras para evaluar el límite de detección (LOD, consulte la tabla 8) y los resultados deben interpretarse como se indica a continuación.

- Frecuencia de la mutación  $< \text{LOD}$ : nativa
- Frecuencia de la mutación  $\geq \text{LOD}$  y  $\leq \text{LOD} + 3$  unidades porcentuales: posible mutación de bajo nivel

**Nota:** si utiliza el Plug-in Report (paso 5 del apartado “Protocolo 6: serie analítica en el PyroMark Q24” en la página 34) y se da este caso, aparecerá un aviso.

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 una muestra que contenga ADN de control no metilado. El resultado de ambos duplicados debería ser  $\geq \text{LOD}$  y distinto de la muestra de control. De lo contrario, la muestra se considera normal.

- Frecuencia de la mutación  $> \text{LOD} + 3$  unidades porcentuales: mutación

Si utiliza EGFR Plug-in Report, la comparación se lleva a cabo de forma automática.

**Nota:** se recomienda utilizar el EGFR 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:** una frecuencia medida superior al LOB en la muestra de control indica un nivel de fondo superior al habitual en la serie analítica correspondiente, lo que puede afectar la cuantificación de los alelos, especialmente en el caso de niveles mutacionales bajos. En estos casos, las frecuencias medidas en el rango del LOD (tabla 8) al  $\text{LOD} + 3$  unidades porcentuales no pueden constituir una base sólida para determinar el estado de la mutación. Se recomienda volver a analizar las muestras con posibles mutaciones de bajo nivel.

**Nota:** las decisiones relativas a la aplicación de tratamientos para pacientes con cáncer no deben basarse únicamente en el estado mutacional del gen EGFR.

**Tabla 8. Valores de LOB y LOD determinados para mutaciones concretas**

<b>Mutación</b>	<b>Sustitución de aminoácidos</b>	<b>LOB (unid. %)</b>	<b>LOD (unid. %)</b>	<b>ID COSMIC* (V47)</b>
<b>Deleciones del exón 19</b>				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 <sup>†</sup>	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 <sup>†</sup>	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T <sup>†</sup>	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 <sup>†</sup>	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C <sup>†</sup>	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 <sup>†</sup>	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 <sup>†</sup>	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 <sup>†</sup>	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

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

<sup>†</sup> Los valores LOD de algunas deleciones poco habituales en el exón 19 se han determinado añadiendo seis desviaciones estándar de las mediciones del blanco al valor del LOB.

La tabla continúa en la página siguiente.

**Tabla 8. Continuación**

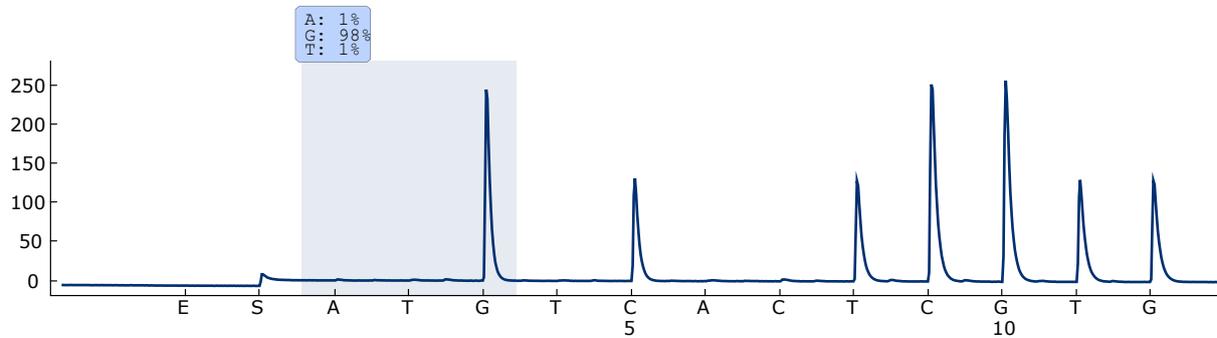
Mutación	Sustitución de aminoácidos	LOB (unid. %)	LOD (unid. %)	ID COSMIC* (V47)
<b>Exón 18 codón 719 (GGC)</b>				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
<b>Exón 20 codón 768 (AGC)</b>				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
<b>Exón 20 codón 790 (ACG)</b>				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
<b>Exón 21 codón 858 (CTG)</b>				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) <sup>†</sup>	6224
<b>Exón 21 codón 861 (CTG)</b>				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

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

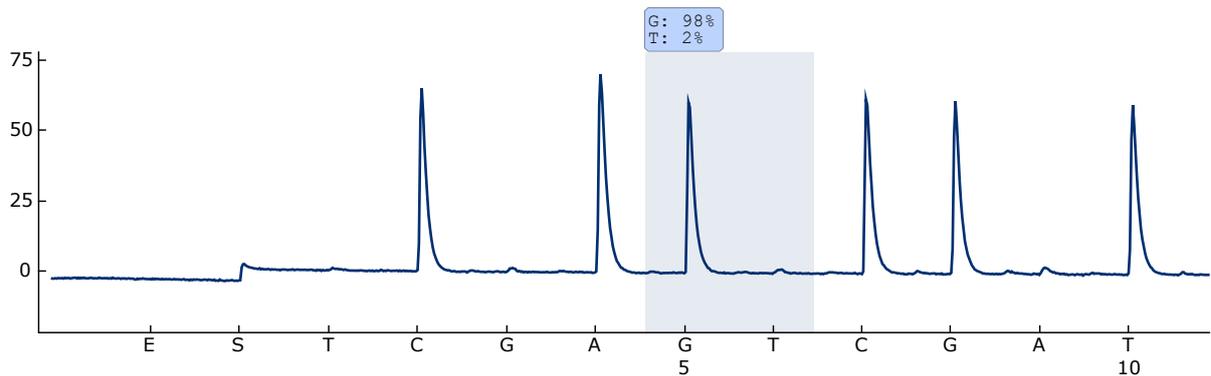
<sup>†</sup> Nivel de mutación mínimo de una muestra que da lugar a una medición de frecuencia  $\geq$ LOD.

## Resultados representativos

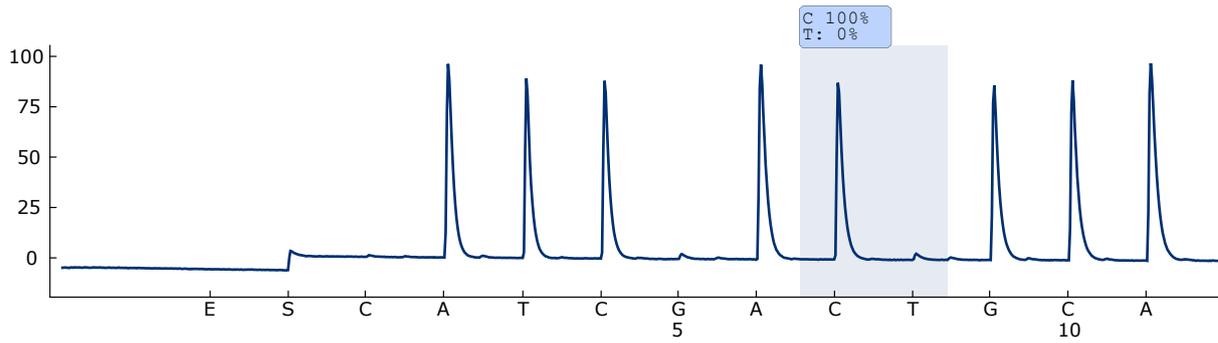
Los resultados representativos del pirograma se muestran en las Ilustraciones 7–14.



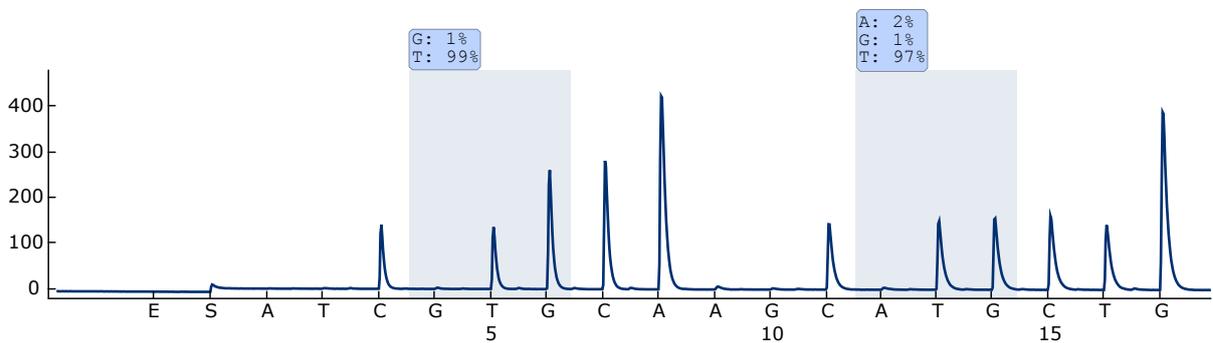
**Ilustración 7.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo en el codón 719 utilizando el valor DGCTCCGGTGC para “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar).



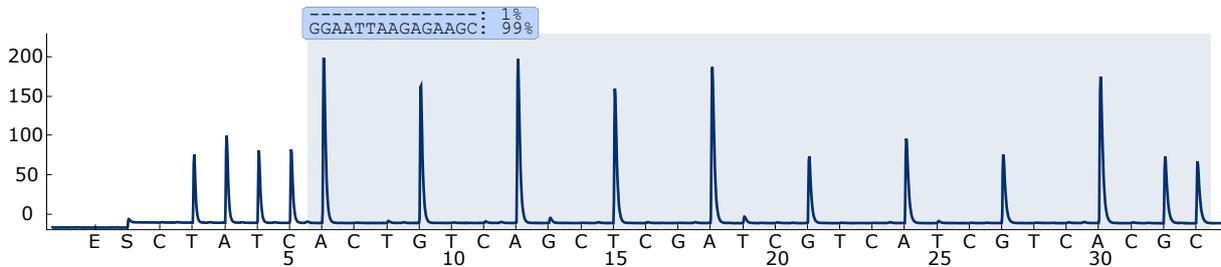
**Ilustración 8.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo en el codón 768 utilizando el valor CAKCGTG para “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar).



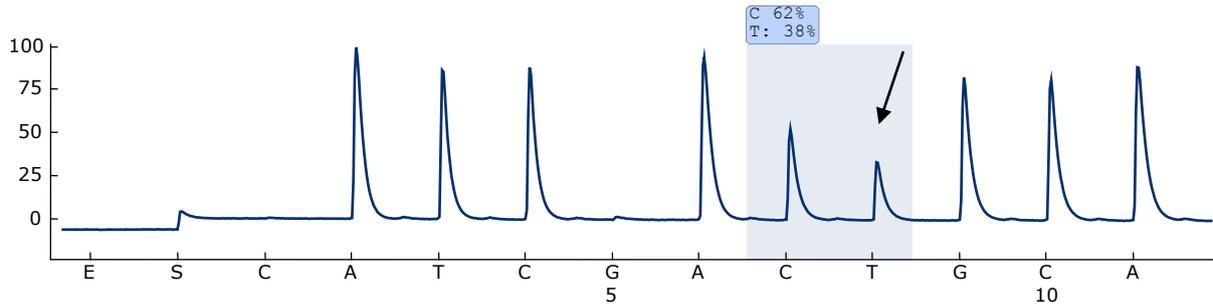
**Ilustración 9.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo en el codón 790 utilizando el valor ATCA YGCAG para "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar).



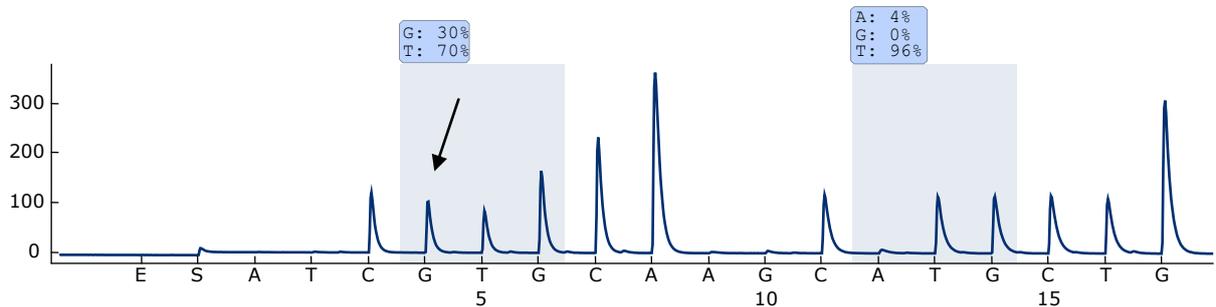
**Ilustración 10.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo normal en los codones 858-861 utilizando el valor CKGGCCAAACDGCTGGGT para "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar).



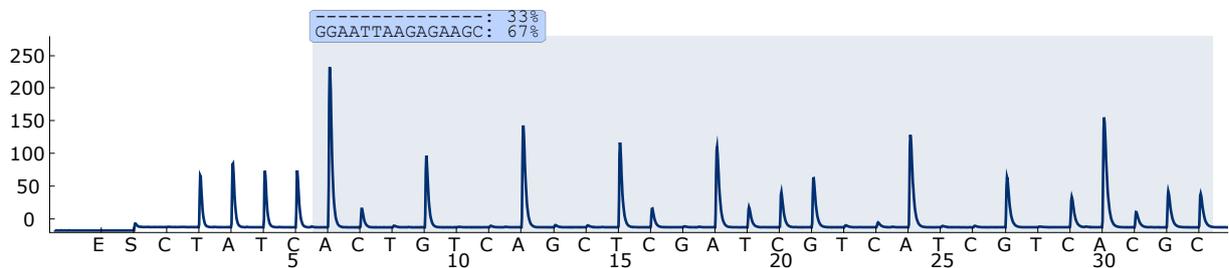
**Ilustración 11.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo en el exón 19.



**Ilustración 12.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con una mutación ACG → ATG en la base 2 del codón 790 (señalado con una flecha).



**Ilustración 13.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con una mutación CTG → CGG en la base 2 del codón 858 (señalado con una flecha).



**Ilustración 14.** Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con una delección 2235del15 en el exón 19.

## Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas es 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](http://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](http://www.qiagen.com)).

Nota: Consulte el manual de usuario del 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.      |

#### **Secuencia débil o no esperada**

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| a) 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 <sup>®</sup> o mediante electroforesis en geles de agarosa). |
|---------------------------------|--|

#### **Resultado "Check" (revisar) o "Failed" (erróneo)**

- |                        |   |
|------------------------|---|
| a) Altura de pico baja | <p>La manipulación de errores durante la configuración de la PCR o la preparación de las muestras previa a la pirosecuenciación puede generar picos bajos. Realice regularmente la prueba de funcionamiento de las sondas de filtros tal como se describe en el manual de usuario del PyroMark Q24 (<i>PyroMark Q24 User Manual</i>) y sustitúyalas según se indique.</p> <p>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.</p> |
|------------------------|---|

## Comentarios y sugerencias

---

- |   |  |
|---|--|
| b) Mutación no definida en "Sequence to Analyze" (secuencia que se debe analizar)   | Ajuste la "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar) en la configuración del ensayo (consulte el Apéndice A en la página 60) y vuelva a analizar la serie.  |
| c) Mutación rara no prevista  | Un valor "Check" (revisar) o "Failed" (erróneo) 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 para analizar). Estas muestras deberían analizarse utilizando los valores alternativos para "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar) teniendo en cuenta las mutaciones no previstas. |
| d) Advertencia de desviación elevada en la altura del pico en la dispensación x   | 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.   |
| e) Aparece el mensaje de advertencia "Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 8" (sin definir/erróneo por una desviación de la altura del pico alto durante la dispensación: 8) en el ensayo del codón 790. | El ruido de fondo durante la dispensación T8 está por debajo del nivel esperado. Ajuste la altura de la barra del histograma al valor predeterminado (1,00) (solo es posible si se utiliza la herramienta de análisis integrada en el software PyroMark Q24).  |

## Comentarios y sugerencias

---

- f) Aparece el mensaje de advertencia "Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 10" (sin definir/erróneo por una desviación de la altura del pico alto durante la dispensación: 10) en el ensayo del codón 858–861.
- Una mutación CTG>CGG de alto nivel en el codón 858 (L858R) puede generar un fondo incrementado en las dispensaciones G-10 y A-12 y una frecuencia superior al LOD para la mutación ATG>CAG del codón 861 (L861Q). En este caso, solamente se considera válida la mutación L585R detectada y se puede omitir la advertencia de calidad "Check" (revisar).
- Nota:** el EGFR Plug-in Report solamente informa de una mutación (p. ej., la mutación con mayor frecuencia).
- e) Aparece el mensaje de advertencia "Uncertain due to high peak height deviation at dispensation: 23" (sin definir por una desviación de la altura del pico alto durante la dispensación: 23) en la notificación de la delección 2235del15.
- Una delección 2235del15 de alto nivel puede dar lugar a esta advertencia. En este caso, se considera válida la mutación detectada y se puede omitir la advertencia de calidad "Check" (Revisar).

### Fondo elevado

- a) Almacenamiento incorrecto de los nucleótidos
- Conserve los nucleótidos a 2–8 °C. Su almacenamiento a una temperatura comprendida entre –15 y –25 °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 <i>therascreen</i> según las instrucciones descritas en el "Protocolo 5: funcionamiento del sistema PyroMark Q24." en la página 31.  |
| 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 del 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* EGFR 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.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN.

## 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 9). Los límites LOB y LOD se han de las recomendaciones de la directriz EP17A del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (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). Los errores  $\alpha$  y  $\beta$  (falsos positivos y falsos negativos respectivamente) se establecieron en un 5%. Los valores LOD de algunas deleciones poco habituales en el exón 19 se han determinado añadiendo seis desviaciones estándar de las mediciones del blanco al 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.

### Mutación CTG → CGG en el codón 858

En el caso de la mutación CTG → CGG del codón 858, las mediciones de muestras con niveles bajos de mutación presentaron una distribución no gaussiana. Por lo tanto, el LOD se determinó con un método distinto, siguiendo las recomendaciones de la directriz EP17A del CLSI. La señal más baja que indica la presencia de una mutación (LOD) en estas posiciones se ha establecido en 2 unidades porcentuales por encima del nivel de referencia respectivo definido por el percentil 95 de las mediciones del blanco. Al analizar una muestra con un nivel de mutación del 5,5%, el 95% de los resultados ( $n = 72$ ) obtuvieron una señal que puede considerarse positiva ( $\geq$ LOD, es decir,  $\geq 2,6$  unidades porcentuales).

**Tabla 9. Valores de LOB y LOD determinados para mutaciones concretas**

Mutación	Sustitución de aminoácidos	LOB (unid. %)	LOD (unid. %)	ID COSMIC* (V47)
<b>Deleciones del exón 19</b>				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15 <sup>†</sup>	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15 <sup>†</sup>	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T <sup>†</sup>	E746_S752>V	0,6	1,6	12384
2237del15 <sup>†</sup>	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C <sup>†</sup>	L747_A750>P	1,8	2,5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18 <sup>†</sup>	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15 <sup>†</sup>	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18 <sup>†</sup>	L747_P753>S	0,9	1,9	12370

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

<sup>†</sup> Los valores LOD de algunas deleciones poco habituales en el exón 19 se han determinado añadiendo seis desviaciones estándar de las mediciones del blanco al valor del LOB.

La tabla continúa en la página siguiente.

**Tabla 9. Continuación**

Mutación	Sustitución de aminoácidos	LOB (unid. %)	LOD (unid. %)	ID COSMIC* (V47)
<b>Exón 18 codón 719 (GGC)</b>				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
<b>Exón 20 codón 768 (AGC)</b>				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
<b>Exón 20 codón 790 (ACG)</b>				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
<b>Exón 21 codón 858 (CTG)</b>				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) <sup>†</sup>	6224
<b>Exón 21 codón 861 (CTG)</b>				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

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

<sup>†</sup> Nivel de mutación mínimo de una muestra que da lugar a una medición de frecuencia  $\geq$ LOD.

**Nota:** estos valores se basan en series analíticas en las que se utilizaron mezclas de plásmidos que incluían la secuencia normal o mutada correspondiente como molde para la amplificación mediante PCR.

**Nota:** se recomienda la confirmación del método de rendimiento en el laboratorio.

## Linealidad

La linealidad se ha determinado mediante mezclas de plásmidos que contenían la secuencia normal o mutada de las mutaciones GGC>AGC en el codón 719, ACG>ATG en el codón 790, CTG>CGG en el codón 858 y las deleciones 2235del15 y 2236del15 en el exón 19. Los plásmidos se mezclaron en diferentes proporciones hasta obtener cuatro niveles de mutación (5, 10, 30 y 50%). Se analizó cada mezcla con tres lotes distintos del kit *therascreen* EGFR Pyro en tres análisis de pirosecuenciación con tres 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 la Ilustración 15 para la deleción 2235del15 en el exón 19.

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%. Se obtuvieron resultados similares para las mutaciones GGC>AGC en el codón 719, ACG>ATG en el codón 790, CTG>CGG en el codón 858 y la deleción 2236del15 en el exón 19.

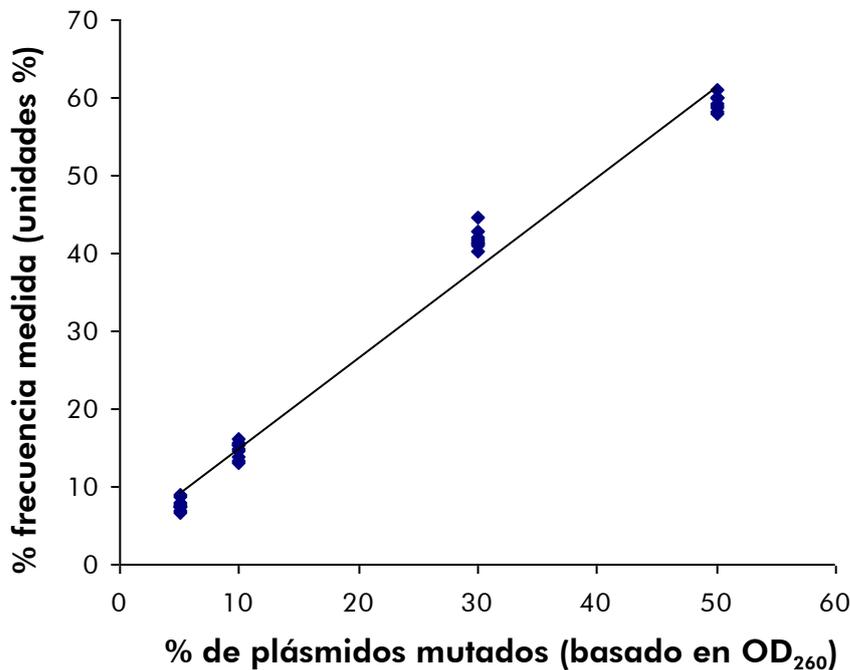


Ilustración 15. Linealidad de la deleción 2235del15 en el exón 19.

## Precisión

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

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

Las estimaciones de precisión se expresan en forma de desviación estándar de las frecuencias de mutación medidas en unidades porcentuales (tabla 10). Los valores de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad para la delección 2235del15 en el exón 19 fueron de 0,8–1,2, 0,7–2,9 y 0,7–1,8 unidades porcentuales, respectivamente, en el intervalo medido con un nivel de mutación comprendido entre el 5 y el 50%. Se obtuvieron resultados similares para las mutaciones GGC>AGC en el codón 719, ACG>ATG en el codón 790, CTG>CGG en el codón 858 y la delección 2236del15 en el exón 19.

**Tabla 10. Precisión de la delección 2235del15 en el exón 19\***

% de plásmido mutado <sup>†</sup>	Repetibilidad		Precisión intermedia		Reproducibilidad	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
5	7,7	0,8	7,4	0,7	7,4	0,7
10	14,7	1,1	14,5	1,3	14,4	1,1
30	41,8	1,2	40,0	2,0	41,5	1,7
50	59,4	1,0	58,2	2,9	60,7	1,8

\* Todos los valores se indican como en unidades porcentuales. SD: desviación estándar (n=9).

<sup>†</sup> Según la medición de la densidad óptica (OD)<sub>260</sub>.

## Evaluación diagnóstica

La evaluación del kit *therascreen* EGFR Pyro se ha realizado mediante una comparación con la secuenciación Sanger y el kit *therascreen* EGFR RGQ. Se extrajo ADN de 100 muestras tumorales de cáncer de pulmón no microcítico

(NSCLC) fijadas en formalina e impregnadas en parafina (FFPE) y se analizaron para detectar mutaciones en los codones 719, 768, 790 y 858–861, así como deleciones y mutaciones complejas en el exón 19.

El ADN se aisló mediante el kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Los análisis se realizaron con el kit *therascreen* EGFR Pyro en el sistema PyroMark Q24, con el kit *therascreen* EGFR RGQ en el Rotor Gene-Q (serie 5plex HRM II), mientras que la secuenciación Sanger se llevó a cabo en el ABI® 3130 Genetic Analyzer.

De las 100 muestras analizadas, fue posible determinar el estado mutacional de todos los codones y del exón 19 en 97 de las muestras mediante los tres métodos. En dos de las muestras resultó imposible establecer el estado mutacional del codón 768 mediante pirosecuenciación, y una de las muestras dio error para la mayoría de los codones con los tres métodos, lo que sugiere que la calidad del ADN era demasiado baja para realizar la amplificación.

Se detectó la mutación de resistencia T790M en una muestra con los tres métodos y la mutación L861Q en una muestra solamente con el método de pirosecuenciación. Se detectaron trece, doce y dieciséis deleciones y mutaciones complejas en el exón 19 mediante pirosecuenciación, Rotor-Gene Q y secuenciación Sanger respectivamente. Tres de las deleciones en el exón 19 detectadas mediante secuenciación Sanger no se pudieron reproducir ni mediante pirosecuenciación ni mediante análisis en Rotor-Gene Q. Se detectó la mutación L858R en tres muestras con los tres métodos, en dos muestras mediante pirosecuenciación y uno de los otros métodos, en una muestra mediante pirosecuenciación solamente, y en una muestra mediante análisis en Rotor-Gene Q solamente. Los resultados se muestran en las tabla 11–14.

No se detectaron mutaciones en los codones 719 y 768 en las 100 muestras con ninguno de los tres métodos.

Al excluir las muestras que dieron error con uno o más métodos, el kit *therascreen* EGFR Pyro y la secuenciación Sanger mostraron una concordancia de resultados del 100%, 98%, 99% y 97% para los codones 790, 858, 861 y el exón 19, respectivamente, mientras que el kit *therascreen* EGFR Pyro y el kit *therascreen* EGFR RGQ mostraron una concordancia de resultados del 100%, 97%, 99% y 99% para los codones 790, 858, 861 y el exón 19, respectivamente (tablas 11–14).

**Tabla 11. Resultados de las muestras de tumores de la piel analizadas en el codón 790**

		Secuenciación Sanger			
		Mutación	Nativa	Desconocido	Total
<b>Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro</b>	<b>Mutación</b>	1	0	1	<b>2</b>
	<b>Nativa</b>	0	98	0	<b>98</b>
	<b>Desconocida</b>	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>98</b>	<b>1</b>	<b>100</b>
		Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutación	Nativa	Desconocido	Total
<b>Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro</b>	<b>Mutación</b>	1	0	1	<b>2</b>
	<b>Nativa</b>	0	98	0	<b>98</b>
	<b>Desconocida</b>	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>98</b>	<b>1</b>	<b>100</b>

**Tabla 12. Resultados de las muestras de tumores de la piel analizadas en el codón 858**

		Secuenciación Sanger			
		Mutación	Nativa	Desconocida	Total
<b>Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro</b>	<b>Mutación</b>	4	2	0	<b>6</b>
	<b>Nativa</b>	0	93	0	<b>93</b>
	<b>Desconocida</b>	0	0	1	<b>1</b>
	<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>95</b>	<b>1</b>	<b>100</b>
		Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutación	Nativa	Desconocida	Total
<b>Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro</b>	<b>Mutación</b>	4	2	0	<b>6</b>
	<b>Nativa</b>	1	92	0	<b>93</b>
	<b>Desconocida</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>95</b>	<b>0</b>	<b>100</b>

**Tabla 13. Resultados de las muestras de tumores de la piel analizadas en el codón 861**

		Secuenciación Sanger			
		Mutación	Nativa	Desconocida	Total
<b>Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro</b>	<b>Mutación</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>Nativa</b>	0	98	0	<b>98</b>
	<b>Desconocida</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
		Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutación	Nativa	Desconocida	Total
<b>Kit <i>therascreen</i> EGFR Pyro</b>	<b>Mutación</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>Nativa</b>	0	98	0	<b>98</b>
	<b>Desconocida</b>	0	0	1	<b>1</b>
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>99</b>	<b>1</b>	<b>100</b>

**Tabla 14. Resultados de las muestras de tumores de la piel analizadas en el exón 19**

		Secuenciación Sanger			
		Mutación	Nativa	Desconocida	Total
<b>Kit therascreen EGFR Pyro</b>	<b>Mutación</b>	13	0	0	<b>13</b>
	<b>Nativa</b>	3	84	0	<b>87</b>
	<b>Desconocida</b>	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>84</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
		Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ			
		Mutación	Nativa	Desconocida	Total
<b>Kit therascreen EGFR Pyro</b>	<b>Mutación</b>	12	1	0	<b>13</b>
	<b>Nativa</b>	0	86	1	<b>87</b>
	<b>Desconocida</b>	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>87</b>	<b>1</b>	<b>100</b>

**Nota:** en todas las series analíticas utilizadas para la determinación de las características de rendimiento, el nivel de señal fue superior a 20 RLU para el ensayo del codón 768 y superior a 30 RLU para los cuatro ensayos restantes, 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 EGFR 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](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) o póngase en contacto con los servicios técnicos de QIAGEN o con su distribuidor local.

## Símbolos

 $\Sigma$ <N>	Contiene suficientes reactivos para <N> pruebas
	Fecha de caducidad
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Referencia
	Número de lote
	Número de material
	Componentes
	Contenido
	Número
	Hidróxido de sodio
	Número mundial de artículo comercial
	Limitación de temperatura
	Fabricante
	Consultar las instrucciones de uso

## Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visítenos en nuestro Centro de Servicio Técnico (Technical Support Center) en [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) o bien póngase en contacto telefónico con el departamento de Servicio Técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Apéndice A: configuración de los ensayos *therascreen* EGFR Pyro

Si se ha instalado el EGFR Plug-in Report, encontrará las configuraciones de ensayo predefinidas para los codones 719, 768, 790 y 858–861, así como para las deleciones en el exón 19, en el navegador de accesos directos del software PyroMark Q24, en la ruta “Example Files/PyroMark Setups/EGFR”. No es necesario llevar a cabo los siguientes pasos. Puede obtener el EGFR Plug-in Report por correo electrónico a través de la dirección [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Se recomienda utilizar EGFR Plug-in Report en lugar de efectuar un análisis manual. Las mutaciones complejas no pueden añadirse manualmente a “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar), por lo que deben analizarse con el complemento. 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 EGFR Plug-In Quick-Start Guide (Guía rápida del complemento EGFR).

Si el EGFR Plug-in Report no se ha instalado, el archivo de ensayo debe configurarse manualmente antes de ejecutar el ensayo de pirosecuenciación del kit *therascreen* EGFR Pyro por primera vez. Defina el ensayo EGFR para el codón 719, codón 768, codón 790, codones 858–861 y las deleciones del exón 19 con el software PyroMark Q24 tal y como se describe a continuación.

### Procedimiento

#### Codón 719 de EGFR

**A1.** Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione “New AQ Assay” (nuevo ensayo AQ).

**A2.** Escriba la siguiente secuencia en “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar).

**DGCTCCGGTGC**

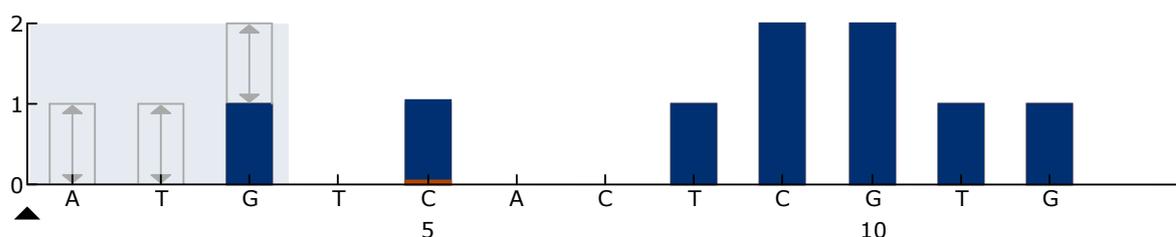
**Nota:** las mutaciones más habituales del codón 719 se detectan en el nucleótido 2155 cuando se utiliza este valor para “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar).

El valor de “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar) puede modificarse después de la serie para analizar las mutaciones del nucleótido 2156. Para comprobar si existe alguna mutación en el nucleótido 2156, modifique el valor de “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar) por la siguiente secuencia:

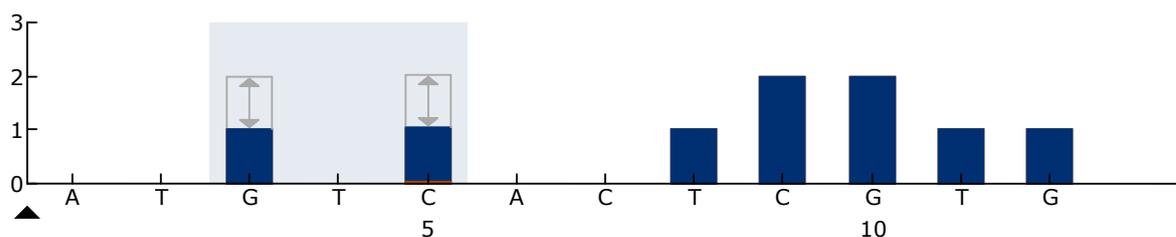
**GSCTCCGGTGC**

**Nota:** asegúrese de que el umbral para la altura de pico único se haya definido en 30 RLU. Compruebe también que las alturas de las barras del histograma se han ajustado correctamente (consulte las instrucciones pertinentes más abajo).

**A3. Introduzca manualmente el siguiente valor para “Dispensation Order” (orden de dosificación):**  
**ATGTCACTCGTG**



**Ilustración 16. Histograma del codón 719 (nucleótido 2155) con el valor DGCTCCGGTGC para la opción “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar).** El rectángulo rojo de la parte inferior de la barra para la dosificación C5 ilustra el ajuste de la altura de la barra del histograma.



**Ilustración 17. Histograma del codón 719 (nucleótido 2156) con el valor GSCTCCGGTGC para la opción “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar).** El rectángulo rojo de la parte inferior de la barra para la dosificación C5 ilustra el ajuste de la altura de la barra del histograma.

**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. En el histograma, desplace el cursor hasta el extremo final de la barra correspondiente a la dosificación C5 y haga clic mientras pulsa el botón “Ctrl”. Aparecerá una pequeña ventana que indica la altura predeterminada de la barra del histograma (1,00). Aumente el nivel a 1,04 para el valor “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar) DGCTCCGGTGC y hasta 2,04 para el valor “Sequence to Analyze” (secuencia para analizar) GSCTCCGGTGC.**

**A6. Haga clic en  en la barra de herramientas y guarde el ensayo como “EGFR codon 719”.**

### Codón 768 de EGFR

- A1. Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione "New AQ Assay" (nuevo ensayo AQ).
- A2. Escriba la siguiente secuencia en "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar).  
**CAKCGTG**
- A3. Añada manualmente el siguiente valor para "Dispensation Order" (orden de dosificación):  
**TCGAGTCGAT**

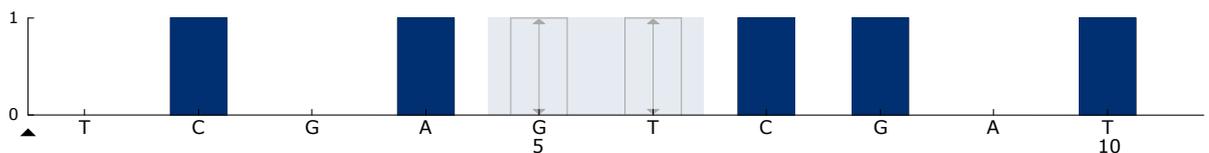


Ilustración 18. Histograma del codón 768 (nucleótido 2303) con el valor **CAKCGTG** para la opción "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar).

- A4. Haga clic en  en la barra de herramientas y guarde el ensayo como "EGFR codon 768".

### Codón 790 de EGFR

- A1. Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione "New AQ Assay" (nuevo ensayo AQ).
- A2. Escriba la siguiente secuencia en "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar):  
**ATCAYGCAG**
- A3. Añada manualmente el siguiente valor para "Dispensation Order" (orden de dosificación):  
**CATCGACTGCA**

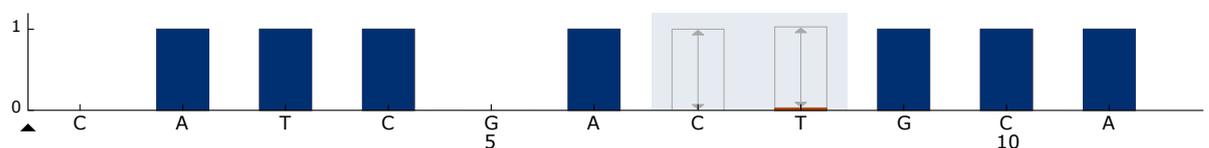


Ilustración 19. Histograma del codón 790 (nucleótido 2369) con el valor **ATCAYGCAG** para la opción "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar). El rectángulo rojo de la parte inferior de la barra para la dosificación T8 ilustra el ajuste de la altura de la barra del histograma.

- 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. En el histograma, desplace el cursor hasta el extremo final de la barra correspondiente a la dosificación T8 y haga clic mientras pulsa el botón "Ctrl". Aparecerá una pequeña ventana que indica la altura predeterminada de la barra del histograma (1,00). Aumente el nivel hasta 1,03.
- A6. Haga clic en  en la barra de herramientas y guarde el ensayo como "EGFR codon 790".

### Codones 858–861 de EGFR

- A1. Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione "New AQ Assay" (nuevo ensayo AQ).
- A2. Escriba la siguiente secuencia en "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar):  
**CKGGCCAAACDGCTGGGT**
- A3. Añada manualmente el siguiente valor para "Dispensation Order" (orden de dosificación):  
**ATCGTGCAAGCATGCTG**

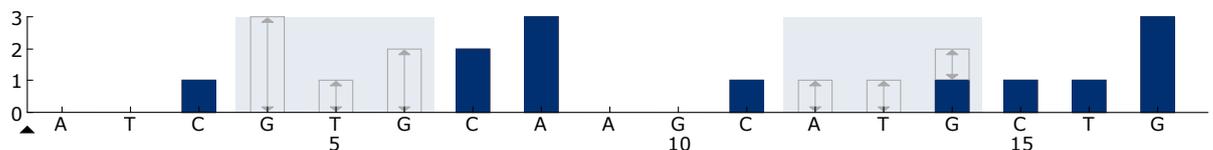


Ilustración 20. Histograma de los codones 858–861 con el valor **CKGGCCAAACDGCTGGGT** para la opción "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar).

- 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 "EGFR codons 858–861".

### Deleciones del exón 19 EGFR

- A1. Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione "New AQ Assay" (nuevo ensayo AQ).
- A2. Escriba la siguiente secuencia en "Sequence to Analyze" (secuencia para analizar):  
**TATCAA[GGAATTAAGAGAAGC]AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA**



## Apéndice B: vaciado del contenedor de residuos y los contenedores

<p><b>ADVERTENCIA</b></p> 	<p><b>Productos químicos peligrosos</b></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 instrumento no estén expuestos a niveles peligrosos de sustancias tóxicas (químicas o biológicas) tal y como se define en las Hojas de datos sobre la seguridad de los materiales (SDS) correspondientes o en los documentos de la OSHA,* la 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](http://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.**

**Nota:** 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 del usuario del PyroMark Q24 (*PyroMark Q24 User Manual*).**

## Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit (24)	Para 24 reacciones en sistemas PyroMark Q24: cebadores de secuenciación, cebadores de PCR, ADN de control no metilado, mezcla maestra para PCR PyroMark, concentrado CoralLoad, tampón de unión PyroMark, tampón de annealing PyroMark, solución de desnaturalización PyroMark, tampón de lavado PyroMark, mezcla de enzimas, mezcla de sustratos, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP y H <sub>2</sub> O	971480
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 (220 V) 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.

<b>Producto</b>	<b>Contenido</b>	<b>Referencia</b>
<b>Accesorios</b>		
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
<b>Productos relacionados</b>		
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](http://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.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.



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

#### **Acuerdo de licencia limitada**

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del kit *therascreen* EGFR Pyro la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit *therascreen* EGFR Pyro debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con el *Manual del kit* *therascreen* EGFR Pyro y solo para uso con los componentes que se incluyen 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 el *Manual del kit* *therascreen* EGFR Pyro y en protocolos adicionales disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
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](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, reservados todos los derechos.

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

