

Junho 2020

Manual do *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit



Versão 2



Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso com os instrumentos Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, ALEMANHA



1121935BR

Conteúdo

Uso previsto	5
Resumo e explicação	6
Princípio do procedimento	9
Materiais fornecidos	13
Conteúdo do kit	13
Materiais necessários, mas não fornecidos	14
Avisos e precauções	16
Precauções gerais	16
Armazenamento e manuseio de reagentes	18
Condições de transporte	18
Condições de armazenamento	18
Armazenamento e manuseio de espécimes	20
Procedimento	21
Extração e preparo de DNA	21
Protocolo: avaliação de amostras	22
Protocolo: detecção de mutações do EGFR	35
Interpretação de resultados (Automatizados)	48
Sinalizadores do Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package	50
Guia de solução de problemas	54
Controle de qualidade	55
Limitações	55

Características de desempenho	57
Desempenho analítico	57
Limite de branco (Limit of Blank, LOB), intervalo de trabalho, valores de cut-off e intervalos de cut-off de ΔC_T	57
Efeito da entrada de DNA em valores de ΔC_T	58
Reatividade cruzada	59
Exatidão: Comparação com o método de referência analítica	59
Valores de limite de detecção (Limit of Detection, LOD)	60
Interferência	62
Reprodutibilidade	63
Desempenho clínico	67
Dados de resultados clínicos: GIOTRIF®	67
Dados de resultados clínicos: IRESSA®	69
Referências	72
Símbolos	74
Anexo A: protocolo manual do <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit	75
Informações gerais	75
Protocolo: criando um perfil de temperatura	75
Procedimento (Manual)	87
Protocolo: avaliação de amostras (manual)	87
Protocolo: detecção de mutações do EGFR (manual)	87
Protocolo: configuração do Rotor-Gene Q do <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit	88
Interpretação de resultados (Manual)	93
Configurações de análise do software	93

Análise de dados de avaliação de amostras	95
Análise de dados de detecção de mutações do EGFR	96
Anexo B: Instalação do <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package.....	105
Informações de contato	109
Informações para pedidos	110
Histórico de revisões do documento	112

Uso previsto

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit é um teste de diagnóstico in vitro para a detecção de 29 mutações somáticas no gene EGFR. Ele fornece uma avaliação qualitativa do status da mutação em amostras de tumores de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP).

Os resultados têm como finalidade ajudar o médico a identificar pacientes com CPCNP que possam se beneficiar do tratamento com terapias de inibidores da tirosina-quinase do EGFR.

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit é usado para testar amostras de DNA extraídas de tecido tumoral fixado em formalina e embebido em parafina (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE) de pacientes com CPCNP e executadas em um instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. O kit deve ser usado por pessoal devidamente treinado, em um ambiente de laboratório profissional.

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit destina-se a uso em diagnóstico in vitro.

Resumo e explicação

Os cânceres humanos apresentam frequentemente mutações do oncogene EGFR (1, 2). A presença dessas mutações é correlacionada à reação a certas terapias de inibidores da tirosina-quinase (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) nos pacientes com CPCNP (3–8). Essas mutações no oncogene EGFR estão presentes na população geral de pacientes com CPCNP com uma frequência de 10% nos pacientes dos EUA, Europa e Austrália e de até 30% nos pacientes do Japão e Taiwan (1, 2, 9).

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit é um kit pronto para uso para a detecção de 29 mutações no gene EGFR relacionado ao câncer usando a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) em um instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Usando as tecnologias Scorpions® (10) e Sistema de Amplificação Refratária de Mutação (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) (11), o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit permite a detecção de 29 mutações nos éxons 18, 19, 20 e 21 do oncogene EGFR em relação a um fundo de DNA genômico de tipo selvagem (Tabela 1). Em resumo:

- 19 deleções no éxon 19 (detecta a presença de qualquer uma das 19 deleções, mas não distingue entre elas)
- Três inserções no éxon 20 (detecta a presença de qualquer uma das três inserções, mas não distingue entre elas)
- G719X (detecta a presença de G719S, G719A ou G719C, mas não distingue entre eles)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

Os métodos usados são altamente seletivos e, dependendo da quantidade total de DNA presente, permitem a detecção de uma porcentagem baixa de DNA mutante em um fundo de DNA genômico de tipo selvagem. Esses limites de seletividade e detecção são superiores a tecnologias como o sequenciamento por terminador fluorescente.

Tabela 1. Lista de mutações e identificações COSMIC

Éxon	Mutação	ID COSMIC*	Mudança de base
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Deleções	12384	2237_2255>T
		12387	2239_2258>CA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		13551	2235_2252>AAT
		12678	2237_2251del15
		6218	2239_2247del9
		12728	2236_2253del18
		12367	2237_2254del18
		6210	2240_2251del12
		6220	2238_2255del18
		6223	2235_2249del15
		6225	2236_2250del15
		6254**	2239_2253del15
		6255	2239_2256del18
		12369**	2240_2254del15
		12370	2240_2257del18
12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C		
12383	2239_2251>C		

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (Catálogo de mutações somáticas no câncer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

A tabela continua na próxima página

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 1. Lista de mutações e identificações COSMIC

Éxon	Mutação	ID COSMIC*	Mudança de base
20	S768I	6241	2303G>T
	Inserções	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (Catálogo de mutações somáticas no câncer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

** As mutações COSM6254 (2239_2253del15) e COSM12369(2240_2254del15) resultam na deleção de 15 pares de base da sequência do EGFR. A mesma sequência final é gerada por ambas as mutações e elas são indistinguíveis uma da outra. Portanto, a mutação COSM6254 (2239_2253del15) foi removida da versão mais recente do COSMIC (v83) e ambas as mutações são representadas agora por COSM12369 (2240_2254del15). Isso segue a diretriz da HGVS sobre a representação da deleção mais próxima da extremidade 3'. O teste de EGFR do *therascreen* não distingue entre qualquer uma das 19 mutações de deleção e qualquer deleção positiva é chamada de "Deletions" (Deleções). Esta alteração afeta somente a documentação e não o kit nem a sua capacidade de detectar qualquer mutação individual.

Princípio do procedimento

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit é composto por oito misturas de reação de amplificação de PCR separadas: sete reações específicas da mutação nos éxons 18, 19, 20 e 21 do oncogene EGFR e um controle de tipo selvagem no éxon 2. Os componentes principais do kit são explicados abaixo.

ARMS

A amplificação específica do alelo ou da mutação é obtida usando a tecnologia ARMS. A *Taq* DNA polimerase (*Taq*) é eficaz para distinguir entre uma correspondência e uma não correspondência na extremidade 3' de um primer da PCR. As sequências mutadas específicas são amplificadas de forma seletiva, mesmo nas amostras em que a maioria das sequências não apresenta a mutação. Quando a base é totalmente correspondida, a amplificação continua com eficiência total. Quando a base 3' não encontra correspondência, ocorre somente a amplificação de fundo de baixo nível.

Scorpions

A detecção da amplificação é realizada com Scorpions. As moléculas Scorpions são moléculas bifuncionais que contêm um primer da PCR unido de forma covalente a uma sonda. O fluoróforo integrado na sonda interage com um supressor, também incorporado na sonda, o que reduz a fluorescência. Durante a PCR, quando a sonda se liga ao amplicon, o fluoróforo e o supressor se separam, originando um aumento detectável da fluorescência.

Formato do kit

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit é fornecido com oito ensaios:

- Um ensaio de controle (CTRL)
- Sete ensaios de mutação

Todas as misturas de reação contêm reagentes para detectar alvos rotulados com carboxifluoresceína (FAM™) e um ensaio de controle interno rotulado com hexaclorofluoresceína (HEX™). O ensaio de controle interno pode detectar a presença de inibidores que podem originar resultados falsos negativos. A amplificação FAM pode superar a amplificação do controle interno e o objetivo do controle interno é simplesmente mostrar que onde não existe amplificação FAM, trata-se de um resultado verdadeiramente negativo e não de uma reação de PCR que falhou.

Ensaio

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit compreende um procedimento de duas etapas. Na primeira etapa, o ensaio de controle é efetuado para avaliar o DNA total amplificável de EGFR em uma amostra. Na segunda etapa, os ensaios de mutação e de controle são ambos efetuados para determinar a presença ou ausência de DNA mutante.

Ensaio de controle

O ensaio de controle, rotulado com FAM, é usado para avaliar o DNA total amplificável de EGFR em uma amostra. O ensaio de controle amplifica uma região do éxon 2 do gene EGFR. Os primers e a sonda Scorpions foram concebidos para evitar quaisquer polimorfismos conhecidos do EGFR.

Ensaio de mutação

Cada ensaio de mutação contém uma sonda Scorpions rotulada com FAM e um primer ARMS para a discriminação entre o DNA de tipo selvagem e um DNA mutante específico.

Controles

Nota: Todas as execuções experimentais devem conter controles positivos e negativos.

Controle positivo

Cada ensaio deve conter um controle positivo nos tubos 1 a 8. O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit contém o Controle positivo (Positive Control, PC) do EGFR para usar como modelo na reação do controle positivo. Os resultados do controle positivo serão avaliados para garantir que o kit tenha um desempenho de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos.

Controle negativo

Cada execução deve conter um controle negativo ("controle sem modelo": No Template Control, NTC) nos tubos 9 a 16. O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit contém água para o NTC para usar como o "modelo" do "controle sem modelo". O controle sem modelo é usado para avaliar qualquer potencial contaminação durante a configuração da execução e para avaliar o desempenho da reação do controle interno.

Avaliação da reação do controle interno

Cada mistura de reação contém um controle interno (Internal Control, IC) além da reação-alvo. Uma falha indica que inibidores poderão estar presentes, os quais podem originar um resultado impreciso, ou que ocorreu um erro de configuração do operador para esse tubo. O IC usa uma sequência-alvo de oligonucleotídeo não relacionada com EGFR, um primer não rotulado e um primer Scorpions rotulado com HEX para distingui-lo dos Scorpions rotulados com FAM nas misturas de reação de controle e mutação. A amplificação FAM pode superar a amplificação do IC para que o valor de C_T (HEX) do IC gerado possa ficar fora do intervalo especificado. Os resultados de FAM continuam sendo válidos para essas amostras.

Avaliação de amostras

É altamente recomendável que a Mistura de reação de controle (CTRL em tubo) fornecida com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit seja usada para avaliar o DNA total amplificável de EGFR em uma amostra. O ensaio de controle amplifica uma região do éxon 2 do gene EGFR. É recomendável que as amostras sejam preparadas somente com o ensaio de controle, usando o PC do EGFR como controle positivo e água para o "modelo" como o controle sem modelo.

Nota: A avaliação do DNA deve basear-se na PCR e poderá diferir da quantificação baseada em leituras de absorbância. É fornecida uma mistura de reação de controle (CTRL em tubo) suplementar para permitir a avaliação da qualidade e quantidade do DNA nas amostras antes da análise com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Plataforma e software

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit foi concebido especificamente para uso com instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. O instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM é programado para diferentes parâmetros de ciclagem ou "execuções" pelo *therascreen* EGFR CE Assay Package.

O *therascreen* EGFR Assay Package é constituído por dois modelos: o "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" (para avaliação de amostras) e o "therascreen EGFR CE Locked Template" (para detecção de mutações do EGFR). Esses modelos contêm os parâmetros de execução da PCR e calculam os resultados.

Também é possível usar o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit com o software Rotor-Gene Q, versão 2.3 no modo aberto (ou seja, sem usar o Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Para obter mais detalhes, consulte Anexo A: protocolo manual do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit				(24)
Referência				874111
Número de reações				24
Cor	Identificação	ID do tubo		Volume
Vermelho	Control Reaction Mix (Mistura de reação de controle)	1	CTRL	2 x 600 µl
Roxo	T790M Reaction Mix (Mistura de reação de T790M)	2	T790M	600 µl
Laranja	Deletions Reaction Mix (Mistura de reação de deleções)	3	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (Mistura de reação de L858R)	4	L858R	600 µl
Verde	L861Q Reaction Mix (Mistura de reação de L861Q)	5	L861Q	600 µl
Amarelo	G719X Reaction Mix (Mistura de reação de G719X)	6	G719X	600 µl
Cinza	S768I Reaction Mix (Mistura de reação de S768I)	7	S768I	600 µl
Azul	Insertions Reaction Mix (Mistura de reação de inserções)	8	Ins	600 µl
Bege	EGFR Positive Control (Controle positivo do EGFR)	9	PC	300 µl
Verde-menta	Taq DNA Polymerase (Taq DNA polimerase)	Taq	2 x 80 µl	2 x 80 µl
Branco	Nuclease-free water for No Template Control (Água livre de nuclease para controle sem modelo)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Branco	Nuclease-free water for Dilution (Água livre de nuclease para diluição)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
<i>Manual do theascreen EGFR RGQ PCR Kit</i>				1

Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Reagentes

- Kit de extração de DNA (consulte Extração e preparo de DNA)

Consumíveis e equipamento geral de laboratório

- Pipetas* de uso exclusivo (ajustáveis) para o preparo de amostras
- Pipetas* de uso exclusivo (ajustáveis) para o preparo de mistura principal de PCR
- Pipetas* de uso exclusivo (ajustáveis) para dispensar o DNA do modelo
- Ponteiras de pipeta livres de DNase, RNase e DNA com filtros (para evitar contaminação cruzada, é recomendável o uso de ponteiras de pipeta com barreira de aerossol)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, para uso com 72-Well Rotor (ref. 981103 ou 981106)
- Tubos de microcentrifugação livres de DNase, RNase e DNA para o preparo de misturas principais
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, bloco de alumínio para o preparo manual da reação com uma pipeta monocalal (ref. 9018901)
- Termo-misturador*, incubadora orbital aquecida*, bloco de aquecimento* ou banho-maria* com capacidade de incubação a 90 °C
- Centrífuga de bancada* com rotor para tubos de reação de 2 ml
- Agitador vórtex*

* Certifique-se de que todos os instrumentos e equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Equipamento para PCR

- Instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM com canais de fluorescência para Cycling Green e Cycling Yellow (detecção de FAM e HEX, respectivamente) * †
- Software Rotor-Gene Q, versão 2.3.5 ou posterior
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package, versão 3.0.6 (disponível para download na página do produto do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit versão 2 em www.qiagen.com. Navegue para Product Resources [Recursos do produto] > Supplementary Protocols [Protocolos suplementares] para baixar o pacote de ensaios.)

Nota: O software do Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package precisa do software Rotor-Gene Q, versão 2.3.5 ou posterior.

* Certifique-se de que todos os instrumentos e equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

† Em alguns países, se aplicável, o instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM com uma data de fabricação de maio de 2011 ou posterior pode ser usado. A data de fabricação pode ser obtida a partir do número de série na parte traseira do instrumento. O número de série está no formato "mmaannn", sendo que "mm" indica o mês de fabricação em dígitos, "aa" indica os últimos dois dígitos do ano de fabricação e "nnn" indica o identificador único do instrumento.

Avisos e precauções

Para uso em diagnóstico in vitro

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF (conveniente e compacto) em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit e para componente do kit QIAGEN.

Para informações de segurança relacionadas ao equipamento Rotor-Gene Q, consulte o manual do usuário fornecido com o equipamento.

Descarte os resíduos da amostra e do ensaio de acordo com as normas de segurança locais.

Precauções gerais

Observe sempre o seguinte.

- O teste destina-se a ser usado com espécimes de tecido FFPE de CPCNP.
- Armazene e extraia materiais positivos (espécimes e controles positivos) de forma separada de todos os outros reagentes e adicione-os à mistura de reação em um local em um espaço separado.
- Tenha muito cuidado para evitar a contaminação das PCRs com o material de controle sintético. É recomendável usar pipetas diferentes, de uso exclusivo, para preparar as misturas de reação e adicionar o modelo de DNA. O preparo e a dispensa das misturas de reação têm de ser efetuados em uma área diferente daquela onde se adiciona o modelo. Os tubos do Rotor-Gene Q não podem ser abertos depois de terminar a execução de PCR. Isso evita a contaminação laboratorial com produtos pós-PCR.

- Todos os produtos químicos e materiais biológicos são potencialmente perigosos. Os espécimes e as amostras são potencialmente infecciosos e devem ser tratados como materiais com risco biológico.
- Os reagentes do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit foram diluídos a uma concentração otimizada. Não dilua mais os reagentes, pois poderia diminuir o seu desempenho. Não use volumes de reação (mistura de reação e amostra) inferiores a 25 µl, pois isso aumentaria o risco de falsos negativos.
- Todos os reagentes fornecidos no *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit destinam-se a ser usados unicamente com os outros reagentes fornecidos no mesmo *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Não substitua os reagentes do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ou faça trocas entre *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits, pois isso poderia afetar o desempenho.
- Use somente a *Taq* DNA polimerase (*Taq*) fornecida no *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Não substitua pela *Taq* DNA polimerase de outros kits do mesmo tipo ou de qualquer outro tipo ou pela *Taq* DNA polimerase de outro fornecedor.
- Não use componentes cuja data de validade tenha expirado nem que tenham sido incorretamente armazenados.

Nota: É preciso ter cuidado para garantir testes de amostras corretos, com destaque para a eliminação de entrada de amostra incorreta, erros de carregamento e erros de pipetagem.

Nota: Os reagentes estão validados para configuração manual. Se um método automático for usado, o número de reações possíveis poderá diminuir, devido aos reagentes necessários para preencher os "volumes mortos" nesses instrumentos.

Armazenamento e manuseio de reagentes

Condições de transporte

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit é expedido em gelo seco e deve chegar ao destino em estado congelado. Se o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit não chegar ao destino em estado congelado, se a embalagem exterior tiver sido aberta durante o transporte ou se a remessa não contiver uma guia de remessa, o manual ou os reagentes, contate a Assistência Técnica da QIAGEN ou o distribuidor local (consulte o verso do manual ou acesse www.qiagen.com).

Condições de armazenamento

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit deve ser armazenado imediatamente após ser recebido, a uma temperatura entre -30 e -15 °C, em um congelador de temperatura constante e protegido da luz. As moléculas Scorpions (tal como todas as moléculas rotuladas com fluorescência) devem estar sempre protegidas da luz para evitar a sua foto-descoloração e a diminuição do desempenho. Quando armazenado nas condições de armazenamento recomendadas e na embalagem original, o kit permanecerá estável até a data de validade impressa no rótulo.

Uma vez abertos, os reagentes podem ser armazenados nas respectivas embalagens originais entre -30 e -15 °C por 12 meses ou até a data de validade impressa na embalagem, o que chegar primeiro. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento sucessivos. É recomendável oito ciclos de congelamento/descongelamento, no máximo.

Os reagentes devem ser descongelados à temperatura ambiente (15 a 25 °C) por um mínimo de 1 hora e um máximo de 4,5 horas. Assim que os reagentes estiverem prontos para usar, as reações de PCR podem ser preparadas e os tubos do Rotor-Gene Q contendo as misturas principais e a amostra de DNA devem ser carregados em um instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM imediatamente. O tempo total a partir do início do preparo da PCR até o início da execução não deve exceder:

- 6 horas se armazenado à temperatura ambiente

Nota: Este tempo inclui o preparo da PCR e o armazenamento.

- 18 horas se armazenado na geladeira (2 a 8 °C)

Nota: Este tempo inclui o preparo da PCR e o armazenamento.

Nota: Para garantir a atividade e o desempenho ideais, as moléculas Scorpions (tal como todas as moléculas rotuladas com fluorescência) devem ser sempre protegidas da luz para evitar a foto-descoloração.

Nota: Para um uso otimizado dos reagentes do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, as amostras devem ser divididas em lotes. Se as amostras forem testadas individualmente, mais reagentes serão usados e diminuirá o número de amostras que podem ser testadas com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Armazenamento e manuseio de espécimes

Nota: Todas as amostras devem ser tratadas como materiais potencialmente infecciosos.

O material da amostra deve ser DNA genômico humano extraído de tecido FFPE. Os espécimes devem ser transportados conforme a metodologia da patologia padrão, para garantir a sua qualidade.

As amostras de tumor são não homogêneas e os dados de uma amostra de tumor podem não corresponder aos dados de outras secções do mesmo tumor. As amostras de tumor também podem conter tecido que não pertence ao tumor. Não está previsto que DNA de tecido não tumoral contenha mutações detectadas pelo *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Para preparar amostras de tecido para a extração de DNA:

- Usando materiais e métodos padrão, fixe o espécime de tecido em formalina neutra tamponada a 10 % (FNT) e embeba o espécime de tecido em parafina. Usando um micrótomo, faça secções em série de 5 µm no bloco de parafina e coloque-as em lâminas de vidro.
- Alguém habilitado (por ex., um patologista) deve avaliar uma secção com coloração Hematoxilina-Eosina (H&E) para confirmar a presença de tumor.
- As secções com coloração não devem ser usadas para a extração de DNA.
- Armazene todas as lâminas e blocos FFPE à temperatura ambiente (15 a 25 °C). As lâminas podem ser armazenadas à temperatura ambiente por até 1 mês antes da extração do DNA.

Procedimento

Extração e preparo de DNA

As características de desempenho deste kit foram geradas usando DNA extraído com o QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (ref. 60404). Esse kit deve ser usado para o preparo do DNA, se disponível no seu país. Se usar o QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (ref. 56404) funcionalmente equivalente, efetue a extração do DNA de acordo com as instruções do manual de instruções, tendo em atenção o seguinte:

- Não use QIAGEN Deparaffinization Solution. Use somente o método de xileno/etanol de desparafinização, descrito no *Manual de Instruções do QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- É importante usar somente etanol de qualidade para biologia molecular* em todas as etapas necessárias.
- Raspe a área inteira do tecido de duas secções em um tubo de microcentrifugação rotulado, usando um bisturi novo para cada amostra.
- A digestão com proteinase K (etapa 11 no *Manual de Instruções do QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) deve ser efetuada durante 1 hora \pm 5 minutos, a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- A digestão com proteinase K (etapa 12 no *Manual de Instruções do QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) deve ser efetuada durante 1 hora \pm 5 minutos, a $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Não use a etapa de RNase descrito no *Manual de Instruções do QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- As amostras devem ser eluídas com 120 μl de tampão de eluição (ATE) do QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (etapa 20 no *Manual de Instruções do QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*).
- O DNA genômico pode ser armazenado entre 2 e 8 $^{\circ}\text{C}$ por uma semana após a extração ou entre -30 e -15 $^{\circ}\text{C}$ por até oito semanas antes de ser usado.

Nota: Todos os ensaios no *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit geram produtos de PCR curtos. Contudo, o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit não funciona com DNA altamente fragmentado.

* Não use álcool desnaturado, pois ele contém outras substâncias, como metanol ou metiletilcetona.

Protocolo: avaliação de amostras

Este protocolo é usado para avaliar o DNA total amplificável em amostras usando o "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" do Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package para a avaliação automática de amostras.

Nota: Para obter informações sobre a avaliação manual de amostras de DNA, consulte o Anexo A: protocolo manual do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Pontos importantes antes de começar

- Para obter resultados corretos, certifique-se de que o procedimento de mistura descrito seja realizado em cada etapa de mistura do processo de configuração do ensaio.
- Até 24 amostras podem ser avaliadas usando a mistura de reação de controle disponível.
- Antes de iniciar o procedimento, leia a seção Precauções gerais.
- Procure familiarizar-se com o instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM antes de iniciar o protocolo. Consulte o manual do usuário do instrumento.
- Não misture com agitação forte a *Taq* DNA polimerase (*Taq* em tubo) nem qualquer mistura que contenha *Taq* DNA polimerase, pois isso poderia inativar a enzima.
- Não misture com agitação forte a *Taq* ou qualquer mistura que contenha *Taq*, pois isso poderia inativar a enzima.
- Utilize a mistura de reação de controle (CTRL em tubo) para avaliar o DNA antes dos testes.

Nota: Para esta avaliação, é importante utilizar a mistura de reação de controle como descrito abaixo e não utilizar espectrofotometria ou outros métodos alternativos. O DNA altamente degradado poderá não amplificar, embora os primers gerem fragmentos curtos de DNA.

- Para um uso mais eficaz dos reagentes do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, crie lotes de amostras de DNA tanto quanto possível para criar execuções completas. Testar amostras individualmente ou em números mais pequenos gasta mais reagentes e reduz o número total de amostras que podem ser testadas somente com um *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

○ que fazer antes de começar

- Certifique-se de que o software do *therascreen* EGFR CE Assay Package esteja instalado antes de usar o instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pela primeira vez (consulte o Anexo B: Instalação do *therascreen* EGFR CE Assay Package).
- Antes de cada uso, todos os reagentes devem ser completamente descongelados por pelo menos 1 hora e por 4,5 horas, no máximo, à temperatura ambiente (15 a 25 °C), misturados invertendo 10 vezes e centrifugados brevemente para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Certifique-se de que a *Taq* esteja à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de cada uso. Efetue uma breve centrifugação do tubo para coletar a enzima no fundo do tubo.
- Misture todas as amostras invertendo 10 vezes e centrifugue brevemente para coletar o conteúdo no fundo do tubo.

Procedimento

1. Descongele a mistura de reação de controle (CTRL), a água livre de nuclease para controle sem modelo (No Template Control, NTC) e o Controle Positivo (Positive Control, PC) do EGFR à temperatura ambiente (15 a 25 °C) por pelo menos uma 1 hora e por 4,5 horas, no máximo.

A Tabela 2 indica os tempos de descongelamento de reagentes, de preparo da PCR e de armazenamento antes de iniciar a execução.

Tabela 2. Tempos de descongelamento, tempos de preparo da PCR e temperaturas de armazenamento

Tempo de descongelamento mínimo	Tempo de descongelamento máximo	Temperatura de armazenamento após o preparo da PCR	Tempo máximo de preparo e armazenamento da PCR
1 h	4,5 h	Temperatura ambiente (15 a 25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2 a 8 °C	18 h

Nota: O preparo da PCR é efetuado à temperatura ambiente (15 a 25 °C). O termo "armazenamento" refere-se ao tempo entre a conclusão do preparo da PCR e o início da execução da PCR no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Nota: A *Taq* deve ser colocada à temperatura ambiente (15 a 25 °C) ao mesmo tempo que os outros reagentes (consulte Armazenamento e manuseio de reagentes). Efetue uma breve centrifugação do tubo para coletar a enzima no fundo do tubo.

- Quando os reagentes estiverem descongelados, misture-os invertendo cada tubo 10 vezes para evitar concentrações localizadas de sais e, em seguida, efetue uma breve centrifugação para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Prepare misturas principais de controle (Mistura de reação de controle [CTRL] mais *Taq*) que sejam suficientes para as amostras de DNA, uma reação de PC do EGFR e uma reação de NTC, de acordo com os volumes exibidos na Tabela 3. Inclua reagentes para uma amostra suplementar para permitir uma quantidade extra suficiente para o preparo da PCR.

Nota: A mistura principal contém todos os componentes necessários para a PCR, exceto a amostra.

Tabela 3. Preparo da mistura principal do ensaio de controle

Componente	Volume
Mistura de reação de controle (CTRL)	19,5 μl x (n + 1)*
<i>Taq</i> DNA polimerase (<i>Taq</i>)	0,5 μl x (n + 1)
Volume total	20 μl /reação

* n = número de reações (amostras e controles). Prepare mistura principal suficiente para uma amostra suplementar (n + 1) para garantir uma quantidade extra suficiente para o preparo da PCR. O valor n não deve exceder 26 (24 amostras e 2 controles).

Nota: Quando a mistura principal for preparada, o volume necessário de mistura de reação de controle é adicionado primeiro no tubo aplicável e a *Taq* é adicionada por último.

- Misture muito bem a mistura principal, pipetando suavemente para cima e para baixo 10 vezes. Coloque o número adequado de firas de tubos no bloco de carregamento, de acordo com a configuração exibida na Tabela 4. Adicione imediatamente 20 μl de mistura principal a cada tira de tubo para PCR.

As tampas permanecem no recipiente plástico até serem necessárias. Para a avaliação das amostras de DNA, a mistura principal do ensaio de controle é adicionada a um tubo de PC, um tubo de NTC e um tubo de cada amostra.

Tabela 4. Configuração dos ensaios de avaliação de amostras de DNA no bloco de carregamento. Os números representam as posições no bloco de carregamento e indicam a posição final no rotor.

Ensaio	Posição								
Controle	1[PC]	9	17	25	-	-	-	-	-
Controle	2[NTC]	10	18	26	-	-	-	-	-
Controle	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Controle	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Controle	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Controle	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Controle	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Controle	8	16	24	-	-	-	-	-	-

5. Adicione imediatamente 5 µl de água para NTC ao tubo na posição 2 e coloque a tampa no tubo.
6. Adicione 5 µl de cada amostra aos tubos de amostra (posições de tubo 3 a 26) e coloque as tampas nos tubos.
7. Adicione 5 µl de PC do EGFR ao tubo na posição 1 e coloque a tampa no tubo.
 Nota: Tome cuidado para evitar erros de carregamento ou de pipetagem, para garantir a adição correta de NTC, de amostras e de PC nos tubos adequados. Marque as tampas dos tubos para indicar a direção de carregamento dos tubos no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
8. Depois de colocar as tampas em todos os tubos da PCR, efetue uma verificação visual dos níveis de preenchimento dos tubos de amostra, para garantir que a amostra foi adicionada a todos os tubos.
9. Inverta todos os tubos de PCR 4 vezes para misturar as amostras e as misturas de reação.
10. Coloque as tiras de tubos para PCR nas posições adequadas no rotor de 72 poços, de acordo com a configuração exibida na Tabela 4.
 Se o rotor não ficar totalmente ocupado, preencha todas as posições vazias do rotor com tubos vazios tampados.

11. Coloque imediatamente o rotor de 72 poços no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Certifique-se de que o anel de travamento (acessório do instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) seja colocado por cima do rotor para prender os tubos durante a execução.

Nota: Caso esteja usando a avaliação manual de amostras, consulte o Anexo A: *protocolo manual do theascreen EGFR RGQ PCR Kit*.

12. Clique duas vezes no ícone "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" (Modelo bloqueado da execução de controle do *therascreen* EGFR CE) da área de trabalho do computador conectado ao instrumento Rotor-Gene Q MDx para iniciar o software do Rotor-Gene Q (Figura 1).



Figura 1. Ícone modelo bloqueado do EGFR CE para a execução do controle (avaliação de amostras).

13. A guia "Setup" (Configuração) é exibida por padrão (Figura 2). Certifique-se de que o anel de travamento esteja fixado corretamente e marque a caixa Locking Ring Attached (Anel de travamento fixado). Feche a tampa do instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

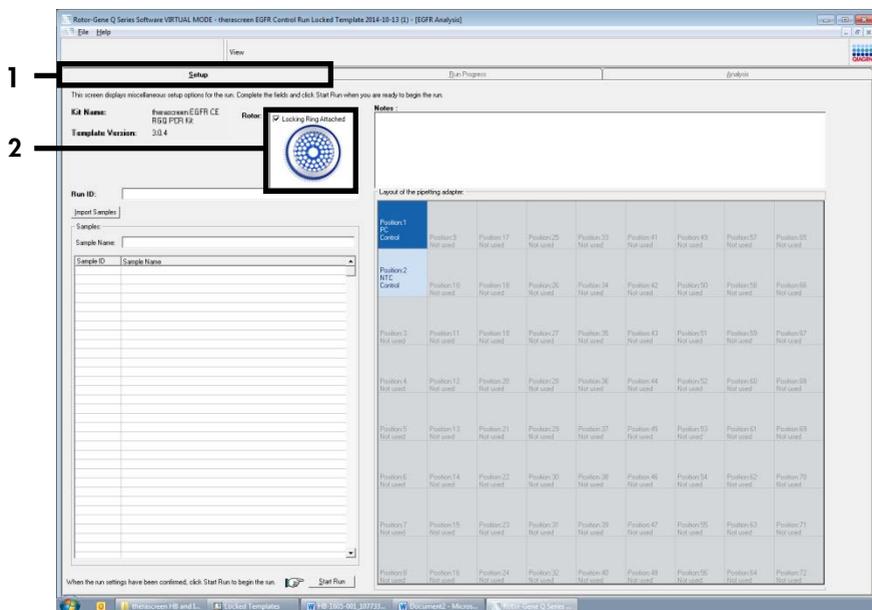


Figura 2. A guia "Setup" (Configuração) (1) e a caixa "Locking Ring Attached" (Anel de travamento fixado) (2).

14. Digite o ID da execução no campo Run ID (ID da execução), de acordo com a convenção de nomenclatura local. Digite o nome da amostra no campo Sample Name (Nome da amostra), de acordo com a convenção de nomenclatura local e pressione a tecla Return (Enter).

Isso adiciona o nome da amostra à lista de amostras abaixo e atribui um "Sample ID" (ID de amostra) à amostra (1, 2, 3 etc.). Além disso, o painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem), do lado direito, será atualizado para incluir o nome da amostra (Figura 3).

Nota: Alternativamente, os nomes de amostras armazenados em formato *.smp (arquivo de amostra Rotor-Gene Q) ou formato *.csv (valores separados por vírgulas) podem ser importados usando o recurso Import Samples (Importar amostras). Os nomes de amostra são introduzidos automaticamente usando este método.

Nota: No painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem), verifique se o nome da amostra adicionado ficou realçado através de uma mudança de cor e se o nome da amostra está na posição da amostra (Figura 3).

Nota: Nomes de amostras com mais de 8 caracteres poderão não ser totalmente visíveis no painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem).

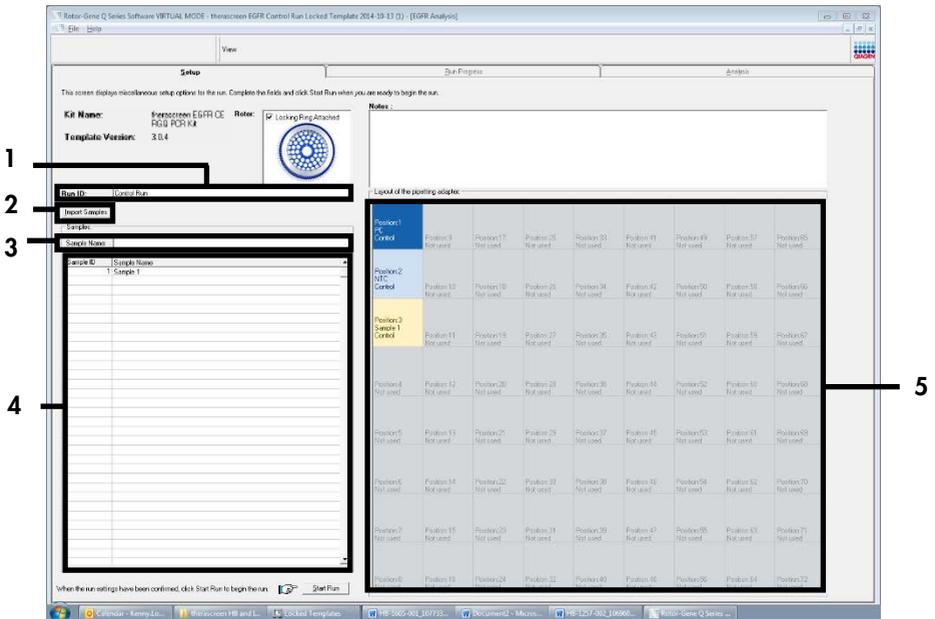


Figura 3. Inserindo o "Run ID" (ID da execução) e o "Sample Name" (Nome da amostra). 1 = campo de diálogo "Run ID" (ID da execução); 2 = painel "Import Samples" (Importar amostras); 3 = campo de diálogo "Sample Name" (Nome da amostra); 4 = "Sample List" (Lista de amostras); 5 = painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem).

15. Repita a etapa 14 para inserir os nomes de todas as amostras adicionais (Figura 4).

Nota: Para editar um nome de amostra, clique no Sample Name (Nome da amostra) na lista de amostras e a amostra selecionada será exibida no campo Sample Name (Nome da amostra) acima. Edite o nome da amostra de acordo com a convenção de nomenclatura local e pressione a tecla Return (Enter) para atualizar o nome.

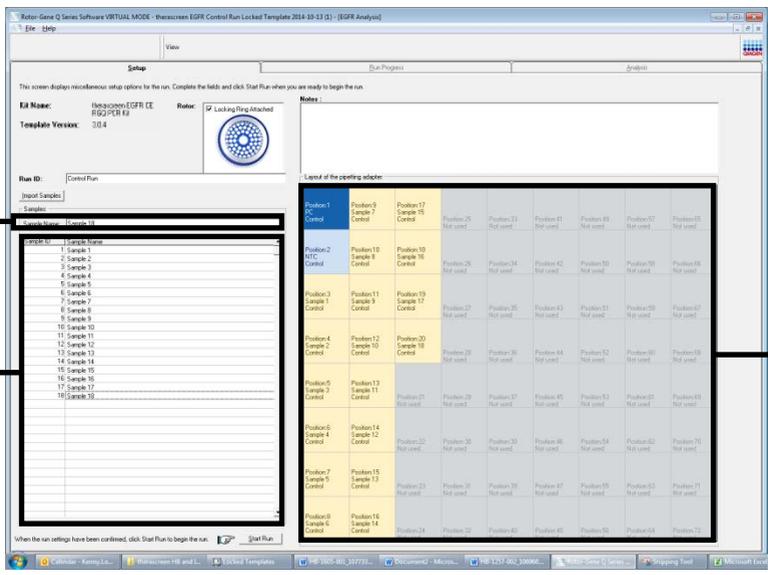


Figura 4. Inserindo nomes de amostras adicionais no campo de diálogo "Sample Name" (Nome da amostra). 1 = campo de diálogo "Sample Name" (Nome da amostra); 2 = "Sample List" (Lista de amostras); 3 = painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem).

16. Quando todos os nomes de amostras tiverem sido inseridos, verifique se eles estão corretos. Caso seja necessário, inclua informações adicionais no campo Notes (Notas) e, em seguida, clique em Start Run (Iniciar execução) (Figura 5).

Nota: Se alguma posição do rotor não for usada, será exibida um "Warning" (Aviso) (Figura 5), para lembrar ao usuário que todas as posições não usadas do rotor devem ser ocupadas por tubos vazios tampados. Certifique-se de que todas as posições não usadas do rotor estejam ocupadas com tubos vazios tampados e clique em OK para continuar. A janela "Save As" (Salvar como) é exibida.

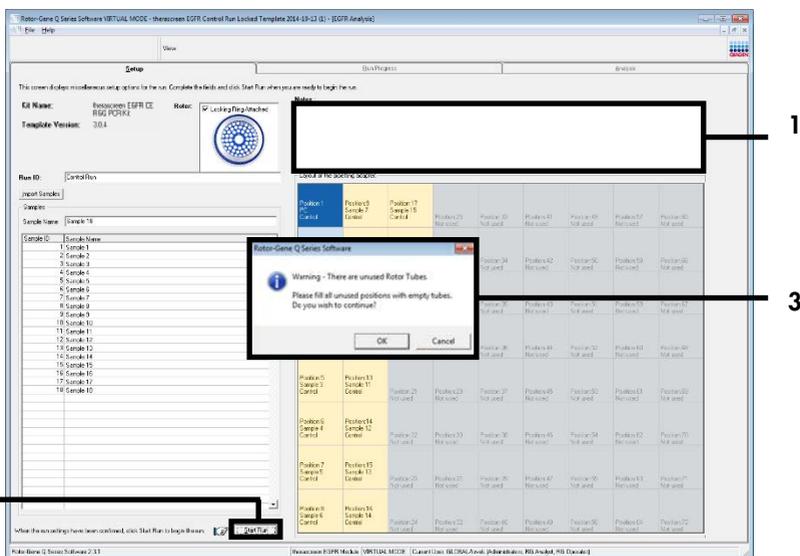


Figura 5. Campo "Notes" (Notas) (1), botão "Start Run" (Iniciar execução) (2) e "Warning" (Aviso) das posições não usadas do rotor (3).

17. Selecione um nome de arquivo adequado e salve a execução da PCR como um arquivo de execução *.rex na localização selecionada. Clique em Save (Salvar) (Figura 6).

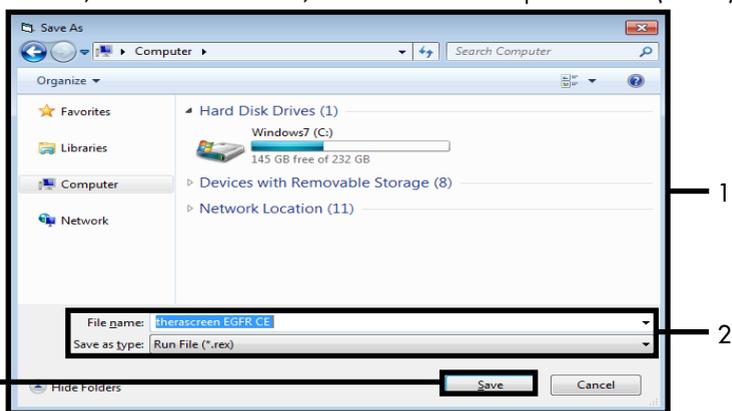


Figura 6. Janela "Save As" (Salvar como) (1), 2 = campos "File Name" (Nome do arquivo) e "Save as type" (Salvar como tipo); 3 = "Save" (Salvar).

A execução da PCR é iniciada.

Nota: Quando a execução começa, a guia "Run Progress" (Evolução da execução) abre para exibir o gráfico da temperatura e o tempo restante da execução (Figura 7).

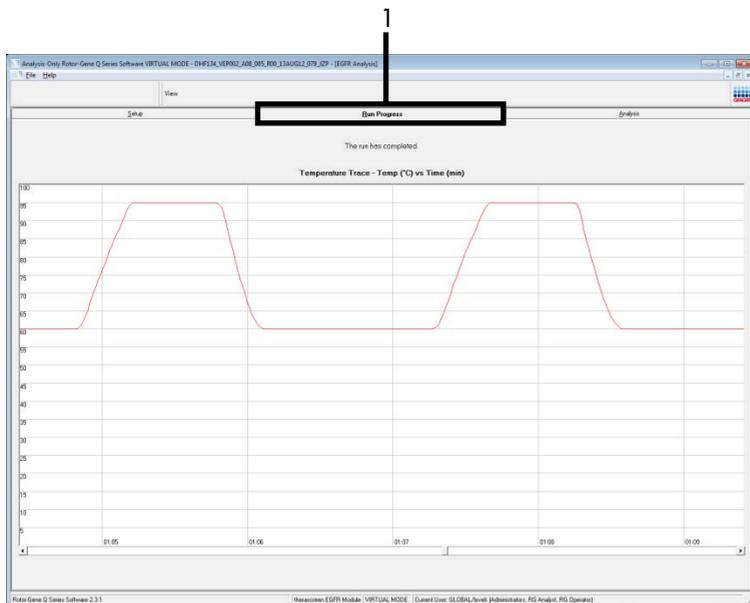


Figura 7. A guia "Run Progress" (Evolução da execução) (1).

Nota: Quando a execução termina, a guia "Analysis" (Análise) abre. Se a guia "Analysis" (Análise) não abrir, clique na guia "Analysis" (Análise) (Figura 8).

Nota: Uma explicação do método de cálculo é apresentada na seção "Interpretação de resultados (Automatizados)".

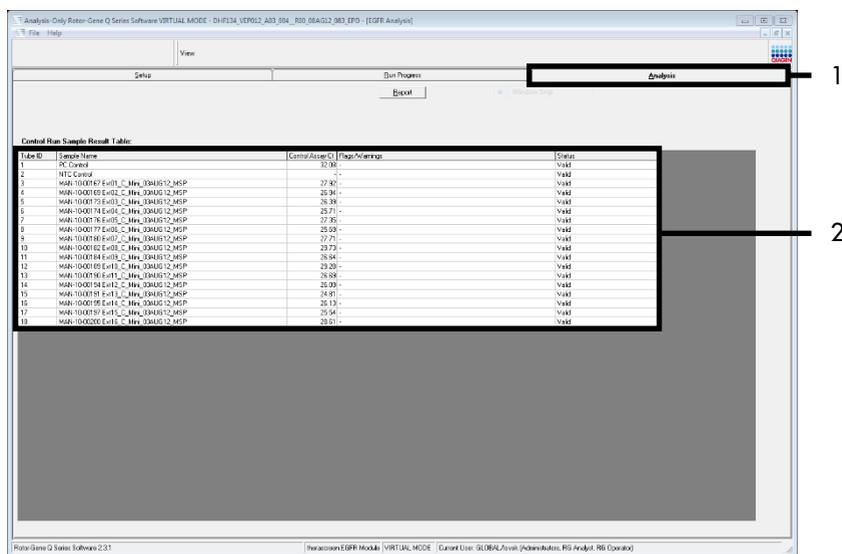


Figura 8. A guia "Analysis" (Análise) (1) e a exibição de resultados (2 = "Control Run Sample Result Table" [Tabela de resultados de amostras da execução de controle]).

Os resultados de controles serão apresentados da seguinte forma na "Control Run Sample Result Table" (Tabela de resultados de amostras da execução de controle) (Figura 8).

Controles da execução (PC e NTC, respectivamente nas posições de tubo 1 e 2). Se os resultados estiverem dentro de intervalos aceitáveis, cada um será exibido como "Valid" (Válido). Caso contrário, um resultado "Invalid" (Inválido) será exibido.

Quando o valor de C_T da reação de controle da amostra é $> 31,10$, ele é indicado como "Invalid" (Inválido). A quantidade de DNA não é suficiente para uma análise de mutação. Teste novamente a amostra. Se a quantidade de DNA continuar sendo insuficiente, extraia mais tecido tumoral, se disponível.

Quando o valor de C_T da reação de controle da amostra é $< 23,70$, ele é indicado como "Invalid" (Inválido). A concentração de DNA é muito alta para uma análise de mutação. Dilua com água livre de nuclease para diluição (Dil.) e teste novamente. Dilua para um C_T de 23,70 a 31,10. Uma diluição de 1:1 aumenta o valor de C_T em aproximadamente 1,0.

Quando o valor de C_T da reação de controle da amostra está entre 23,70 e 31,10 ($23,70 \leq C_T \text{ de controle} \leq 31,10$), ele é indicado como "Valid" (Válido). A concentração de DNA é adequada para uma análise de mutação.

Nota: Se for necessário efetuar a reextração ou diluição, repita a reação de controle para confirmar que a concentração de DNA é adequada para uso.

18. Clique em Report (Relatório) para criar um arquivo de relatório. A janela "Report Browser" (Navegador de relatórios) será exibida. Selecione EGFR CE Analysis Report (Relatório de análise EGFR CE) em "Templates" (Modelos) e, em seguida, clique em Show (Exibir) (Figura 9).

Nota: Para salvar relatórios em uma localização alternativa no formato Web Archives, clique em Save As (Salvar como) no canto superior esquerdo de cada relatório.

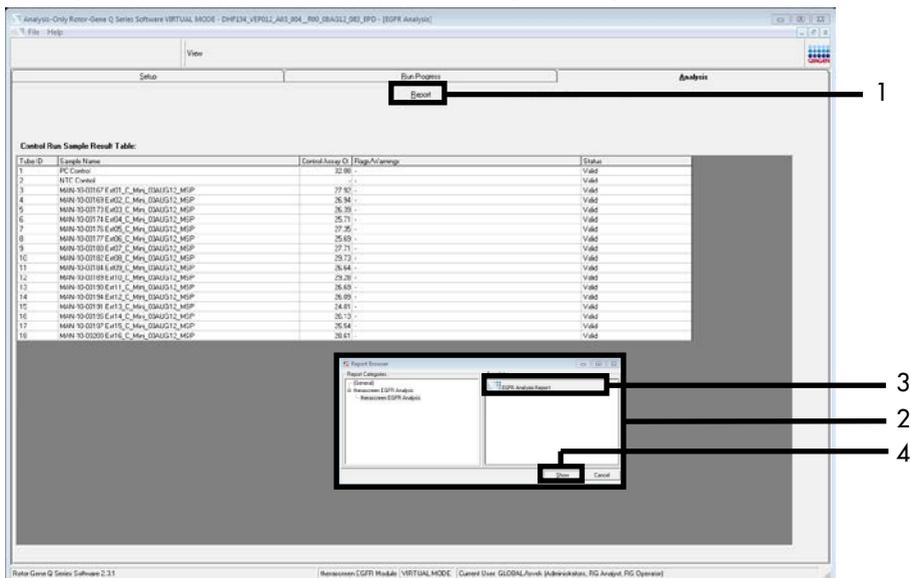


Figura 9. Selecionando o "EGFR CE Analysis Report" (Relatório de análise EGFR CE). 1 = "Report" (Relatório); 2 = janela "Report Browser" (Navegador de relatórios); 3 = seleção "EGFR Analysis Report" (Relatório de análise EGFR); 4 = "Show" (Exibir).

Protocolo: detecção de mutações do EGFR

Este protocolo serve para a detecção de mutações do EGFR. Quando uma amostra tiver sido aprovada na avaliação de amostras de DNA, ela pode ser testada com os ensaios de mutação do EGFR usando software automatizado.

Nota: Para obter informações sobre a detecção manual de mutações, consulte o Anexo A: *protocolo manual do theascreen EGFR RGQ PCR Kit*.

Pontos importantes antes de começar

- Para obter resultados corretos, certifique-se de que o procedimento de mistura descrito seja realizado em cada etapa de mistura do processo de configuração do ensaio.
- Antes de iniciar o procedimento, leia a seção Precauções gerais.
- Procure familiarizar-se com o instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM antes de iniciar o protocolo. Consulte o manual do usuário do instrumento.
- Depois de ter passado o processo de avaliação de amostras de DNA, uma amostra pode ser testada usando os ensaios de mutação do EGFR.
- Para um uso eficiente do *theascreen EGFR RGQ PCR Kit*, as amostras devem ser agrupadas em lotes de sete. O uso de lotes menores significa que menos amostras podem ser testadas com o *theascreen EGFR RGQ PCR Kit*.
- Uma amostra pode ser testada usando todas as misturas de reação fornecidas no *theascreen EGFR RGQ PCR Kit*.
- Não misture com agitação forte a *Taq* ou qualquer mistura que contenha *Taq*, pois isso poderia inativar a enzima.
- Pipete cuidadosamente a *Taq* colocando a ponta da pipeta ligeiramente abaixo da superfície do líquido para evitar que a ponta seja revestida com excesso de enzima.

○ que fazer antes de começar

- Certifique-se de que o software do *therascreen* EGFR CE Assay Package esteja instalado antes de usar o instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pela primeira vez (consulte o Anexo B: Instalação do *therascreen* EGFR CE Assay Package).
- Antes de cada uso, todos os reagentes devem ser completamente descongelados por pelo menos 1 hora e por 4,5 horas, no máximo, à temperatura ambiente (15 a 25 °C), misturados invertendo 10 vezes e centrifugados brevemente para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Misture todas as amostras invertendo 10 vezes e centrifugue com brevidade para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Certifique-se de que a *Taq* esteja à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de cada uso. Efetue uma breve centrifugação do tubo para coletar a enzima no fundo do tubo.

Procedimento

1. Descongele todos os tubos de mistura de reação, a água para NTC e o PC do EGFR à temperatura ambiente (15 a 25 °C) por pelo menos uma 1 hora e por 4,5 horas, no máximo.

A Tabela 5 indica os tempos de descongelamento de reagentes, de preparo da PCR e de armazenamento antes de iniciar a execução.

Tabela 5. Tempos de descongelamento, tempos de preparo da PCR e temperaturas de armazenamento

Tempo de descongelamento mínimo	Tempo de descongelamento máximo	Temperatura de armazenamento após o preparo da PCR	Tempo máximo de preparo e armazenamento da PCR
1 h	4,5 h	Temperatura ambiente (15 a 25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2 a 8 °C	18 h

Nota: O preparo da PCR é efetuado à temperatura ambiente (15 a 25 °C). Armazenamento refere-se ao tempo entre a conclusão do preparo da PCR e o início da execução da PCR no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Nota: A *Taq* (*Taq* em tubo) deve ser colocada à temperatura ambiente (15 a 25 °C) ao mesmo tempo que os outros reagentes (consulte Armazenamento e manuseio de reagentes). Efetue uma breve centrifugação do tubo para coletar a enzima no fundo do tubo.

- Quando os reagentes estiverem descongelados, misture-os invertendo cada tubo 10 vezes para evitar concentrações localizadas de sais e, em seguida, efetue uma breve centrifugação para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Prepare misturas principais de ensaio (mistura de reação de ensaio mais *Taq*) que sejam suficientes para as amostras de DNA, um PC do EGFR e uma reação de NTC, de acordo com os volumes exibidos na Tabela 6. Inclua reagentes para uma amostra suplementar para permitir uma quantidade extra suficiente para o preparo da PCR.

As misturas principais contêm todos os componentes necessários para a PCR, exceto a amostra.

Tabela 6. Preparo das misturas principais de ensaio

Ensaio	Tubo de mistura de reação	Volume da mistura de reação	Volume da <i>Taq</i> DNA polimerase (<i>Taq</i> em tubo)
Controle	CTRL	19,5 µl x (n + 1)*	0,5 µl x (n + 1)*
T790M	T790M	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
Deleções	Del	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
L858R	L858R	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
L861Q	L861Q	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
G719X	G719X	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
S768I	S768I	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
Inserções	Ins	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)

* n = número de reações (amostras e controles). Prepare mistura principal suficiente para uma amostra suplementar (n + 1) para garantir uma quantidade extra suficiente para o preparo da PCR. O valor n não deve exceder sete (com controles), já que sete é o número máximo de amostras que podem ser incluídas em uma execução.

- Misture muito bem as misturas principais de ensaio, pipetando suavemente para cima e para baixo 10 vezes. Coloque o número adequado de tiras de tubos no bloco de carregamento, de acordo com a configuração exibida na Tabela 7. Adicione imediatamente 20 µl da mistura principal de ensaio adequada a cada tira de tubo para PCR.

As tampas permanecem no recipiente plástico até serem necessárias.

Tabela 7. Configuração dos ensaios de controle e mutação no bloco de carregamento. Os números representam as posições no bloco de carregamento e indicam a posição final no rotor.

Ensaio	Controles		Posição						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Controle	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Deleções	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Inserções	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Adicione imediatamente 5 µl de água para NTC aos tubos nas posições 9 a 16 e coloque tampas nos tubos.
- Adicione 5 µl de cada amostra aos tubos de amostra (posições de tubos 17 a 24, 25 a 32, 33 a 40, 41 a 48, 49 a 56, 57 a 64 e 65 a 72) e coloque tampas nos tubos.
- Adicione 5 µl de PC do EGFR aos tubos nas posições 1 a 8 e coloque tampas nos tubos. Tome cuidado para evitar erros de carregamento ou de pipetagem, para garantir a adição correta de NTC, de amostras e de PC do EGFR nos tubos adequados.

Cada tubo deve conter um volume de reação total de 25 µl (20 µl de mistura principal de ensaio preparada na etapa 3 (Tabela 6) mais 5 µl de NTC/amostra/PC). Os números representam as posições no bloco de carregamento e indicam a posição final no rotor.

Marque as tampas dos tubos para indicar a direção de carregamento dos tubos no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

8. Depois de colocar as tampas em todos os tubos da PCR, efetue uma verificação visual dos níveis de preenchimento dos tubos de amostra, para garantir que a amostra foi adicionada a todos os tubos.
9. Inverta todos os tubos da PCR 4 vezes para misturar as amostras e as misturas de reação.
10. Coloque as tiras de tubos para PCR nas posições adequadas no rotor de 72 poços, de acordo com a configuração exibida na Tabela 7.

Em cada execução de PCR podem ser incluídas até 7 amostras. Se o rotor não ficar totalmente ocupado, preencha todas as posições vazias do rotor com tubos vazios tampados.

11. Coloque imediatamente o rotor de 72 poços no instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Certifique-se de que o anel de travamento (acessório do instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) seja colocado por cima do rotor para prender os tubos durante a execução.

Nota: Se estiver usando a detecção manual de mutações do EGFR, consulte o Anexo A: Protocolo manual do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

12. Clique duas vezes no ícone "*therascreen* EGFR CE Locked Template" (Modelo bloqueado do *therascreen* EGFR CE) na área de trabalho do laptop conectado ao instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM para iniciar o software Rotor-Gene Q (Figura 10).



Figura 10. Ícone EGFR CE Locked Template (Modelo bloqueado do EGFR CE) (detecção de mutações do EGFR).

13. A guia "Setup" (Configuração) é exibida por padrão (Figura 11). Certifique-se de que o anel de travamento esteja fixado corretamente e marque a caixa Locking Ring Attached (Anel de travamento fixado). Feche a tampa do instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

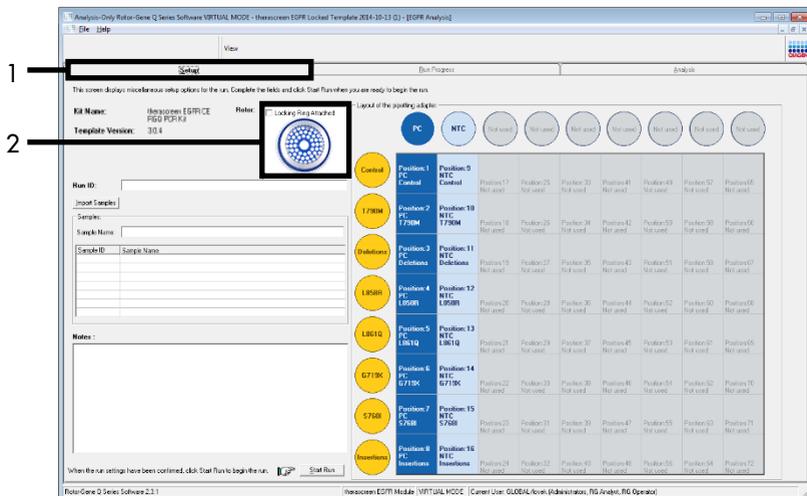


Figura 11. A guia "Setup" (Configuração) (1) e a caixa "Locking Ring Attached" (Anel de travamento fixado) (2).

14. Digite o ID da execução no campo Run ID (ID da execução), de acordo com a convenção de nomenclatura local. Digite o nome da amostra no campo Sample Name (Nome da amostra), de acordo com a convenção de nomenclatura local e pressione a tecla Return (Enter).

Isso adiciona o nome da amostra à lista de amostras abaixo e atribui um "Sample ID" (ID de amostra) à amostra (1, 2, 3 etc.). Além disso, o painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem), do lado direito, será atualizado para incluir o nome da amostra (Figura 12).

Nota: Alternativamente, os nomes de amostras armazenados em formato *.smp (arquivo de amostra Rotor-Gene Q) ou formato *.csv (valores separados por vírgulas) podem ser importados usando o botão Import Samples (Importar amostras). Os nomes de amostra são introduzidos automaticamente usando este método.

Nota: No painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem), verifique se o nome da amostra adicionado ficou realçado através de uma mudança de cor e se o nome da amostra está na posição da amostra (Figura 12).

Nota: Até 7 amostras podem ser adicionadas. Os IDs de amostras (nos círculos de amostras) são atribuídos automaticamente, de 1 a 7.

Nota: Nomes de amostras com mais de 8 caracteres poderão não ser totalmente visíveis no painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem).

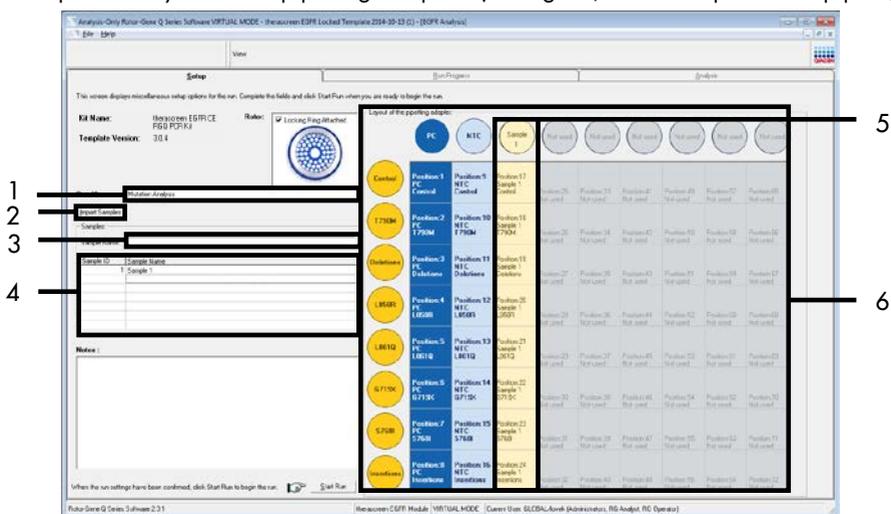


Figura 12. Inserindo o "Run ID" (ID da execução) e o "Sample Name" (Nome da amostra). 1 = campo de diálogo "Run ID" (ID da execução); 2 = botão "Import Samples" (Importar amostras); 3 = campo de diálogo "Sample Name" (Nome da amostra); 4 = "Sample List" (Lista de amostras); 5 = painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem); 6 = círculo de amostra e coluna de 8 ensaios abaixo realçados.

15. Repita a etapa 14 para inserir os nomes de todas as amostras adicionais (Figura 13).

Nota: Para editar um nome de amostra, clique no Sample Name (Nome da amostra) na lista de amostras e a amostra selecionada será exibida no campo Sample Name (Nome da amostra) acima. Edite o nome da amostra de acordo com a convenção de nomenclatura local e pressione a tecla Return (Enter) para atualizar o nome.

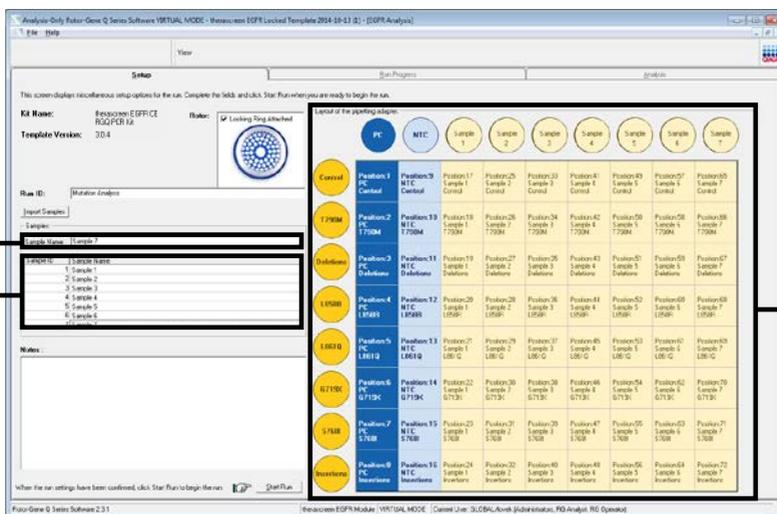


Figura 13. Inserindo nomes de amostras adicionais no campo de diálogo "Sample Name" (Nome da amostra).
 1 = campo de diálogo "Sample Name" (Nome da amostra); 2 = "Sample List" (Lista de amostras); 3 = painel "Layout of the pipetting adapter" (Configuração do adaptador de pipetagem).

16. Quando todos os nomes de amostras tiverem sido inseridos, verifique se eles estão corretos. Caso seja necessário, inclua informações adicionais no campo Notes (Notas) e, em seguida, clique em Start Run (Iniciar execução) (Figura 14).

Nota: Se alguma posição do rotor não for usada, será exibida um "Warning" (Aviso) (Figura 14), para lembrar ao usuário que todas as posições não usadas do rotor devem ser ocupadas por tubos vazios tampados. Certifique-se de que todas as posições não usadas do rotor estejam ocupadas com tubos vazios tampados e clique em OK para continuar.

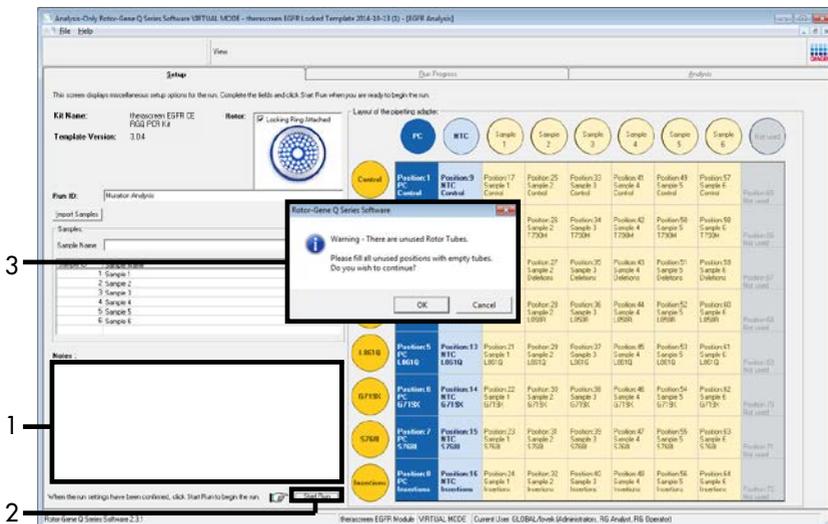


Figura 14. Campo "Notes" (Notas) (1), o botão "Start Run" (Iniciar execução) (2) e "Warning" (Aviso) das posições não usadas do rotor (3).

17. A janela "Save As" (Salvar como) é exibida. Insira um nome de arquivo adequado e salve a execução da PCR como um arquivo de execução *.rex na localização selecionada. Clique em "Save" (Salvar) (Figura 15).

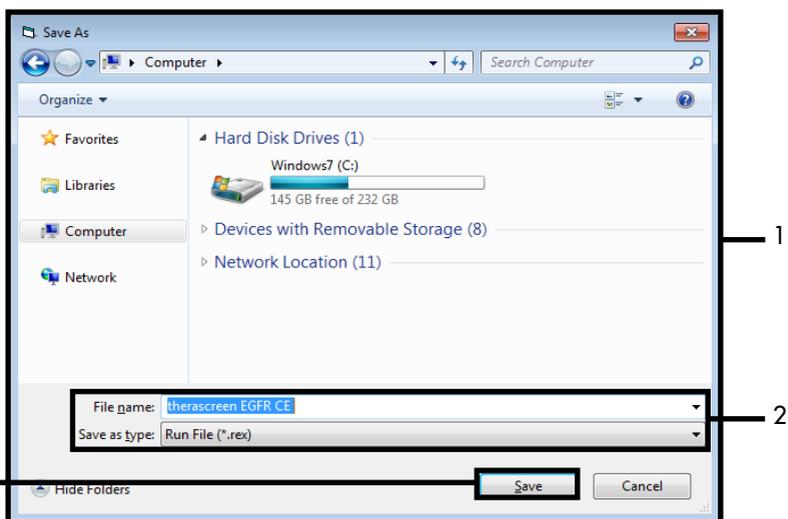


Figura 15. Janela "Save As" (Salvar como) (1). 2 = campos "File Name" (Nome do arquivo) e "Save as type" (Salvar como tipo); 3 = "Save" (Salvar).

A execução da PCR é iniciada.

Nota: Quando a execução começa, a guia "Run Progress" (Evolução da execução) abre para exibir o gráfico da temperatura e o tempo restante da execução (Figura 16).

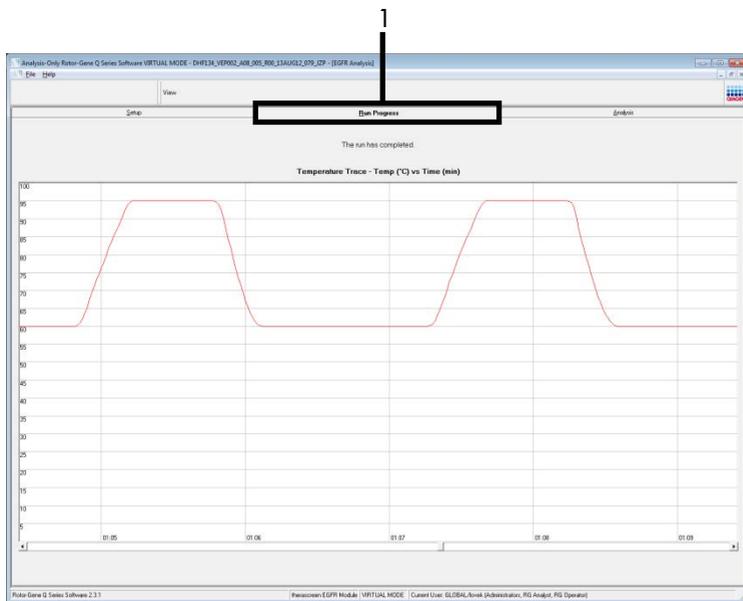


Figura 16. A guia "Run Progress" (Evolução da execução).

Quando a execução termina, a guia "Analysis" (Análise) abre.

Nota: Se a guia "Analysis" (Análise) não abrir, clique na guia "Analysis" (Análise) (Figura 17).

Nota: Uma explicação do método de cálculo é apresentada na seção "Interpretação de resultados (Automatizados)".

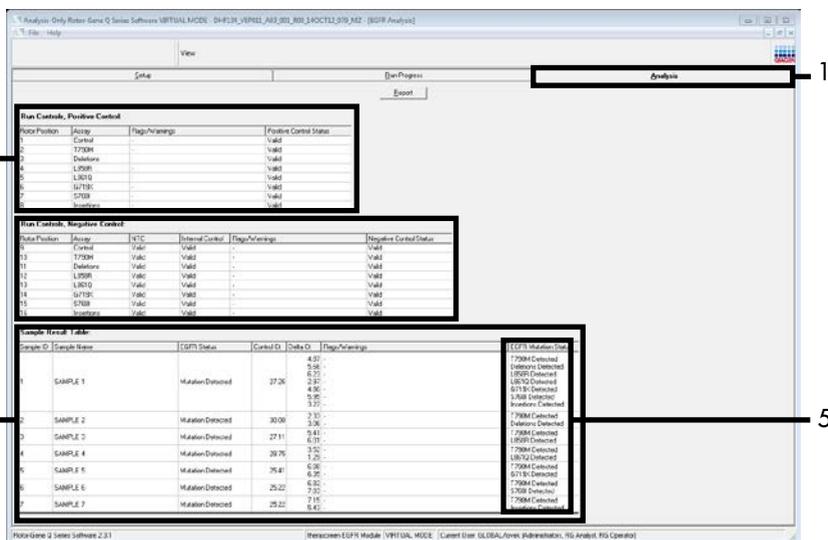


Figura 17. A guia "Analysis" (Análise) (1) e a exibição de resultados. 2 = painel "Run Controls, Positive Control" (Controles da execução, Controle positivo); 3 = painel "Run Controls, Negative Control" (Controles da execução, Controle negativo); 4 = "Sample Result Table" (Tabela de resultados de amostras); 5 = painel "Mutation Status" (Status da mutação).

Os resultados do ensaio são exibidos da seguinte forma (Figura 18).

Run Controls, Positive Control (Controles da execução, Controle positivo): Se os resultados estiverem dentro do intervalo aceitável, o "Positive Control Status" (Status do controle positivo) exibirá "Valid" (Válido), caso contrário exibirá um resultado "Invalid" (Inválido).

Run Controls, Negative Control (Controles da execução, Controle negativo): Se os resultados de "NTC" e "Internal Control" (Controle interno) se encontrarem dentro dos intervalos aceitáveis, o "Negative Control Status" (Status do controle negativo) exibirá "Valid" (Válido), caso contrário exibirá um resultado "Invalid" (Inválido).

Sample Result Table (Tabela de resultados de amostras): Na coluna "EGFR Mutation Status" (Status de mutação do EGFR), serão relatadas as mutações específicas das amostras positivas quanto a mutação.

18. Clique em Report (Relatório) para criar um arquivo de relatório. A janela "Report Browser" (Navegador de relatórios) será exibida. Selecione EGFR CE Analysis Report (Relatório de análise EGFR CE) em Templates (Modelos) e, em seguida, clique em Show (Exibir) (Figura 18).

Nota: Para salvar um relatório em uma localização alternativa no formato Web Archives, clique em Save As (Salvar como) no canto superior esquerdo de cada relatório.

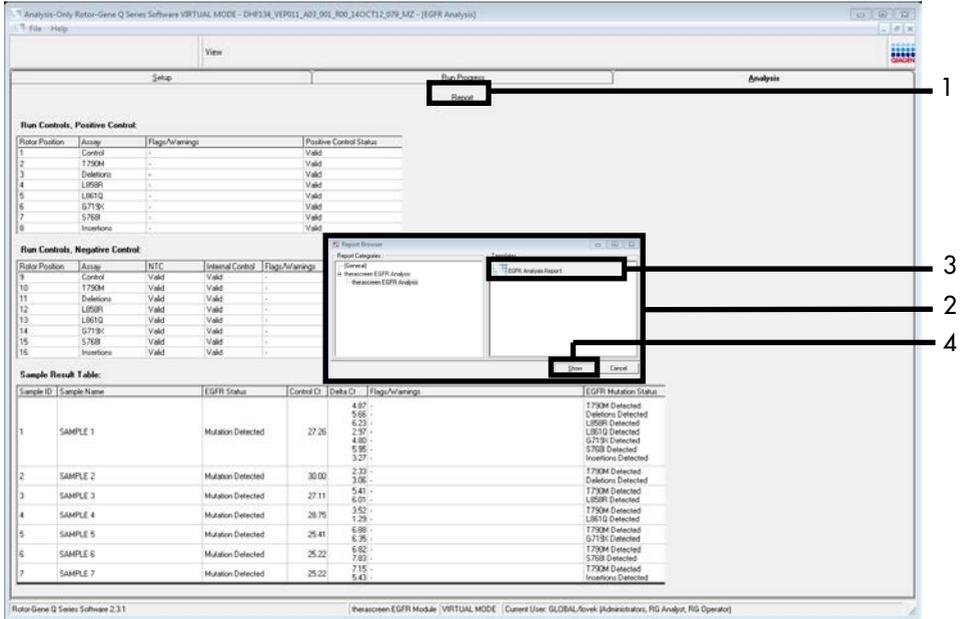


Figura 18. Selecionando o "EGFR CE Analysis Report" (Relatório de análise EGFR CE). 1 = "Report" (Relatório); 2 = painel "Report Browser" (Navegador de relatórios); 3 = "EGFR CE Analysis Report" (Relatório de análise EGFR CE); 4 = "Show" (Exibir).

Interpretação de resultados (Automatizados)

Depois de completar uma execução, o *therascreen* EGFR Assay Package efetua automaticamente a análise e as determinações de mutação. As informações seguintes explicam como o *therascreen* EGFR Assay Package efetua a análise e as determinações de mutação.

Nota: Para obter mais informações sobre a análise manual de resultados, consulte a seção "Interpretação de resultados (Manual)".

O ciclo da PCR em que a fluorescência de uma determinada reação passa um valor limite é definido como o valor de C_T . Os valores de C_T indica a quantidade de DNA específico de entrada. Valores baixos de C_T indicam níveis de entrada de DNA mais elevados e valores altos de C_T indicam níveis de entrada de DNA mais baixos. As reações com um valor C_T são classificadas como amplificações positivas.

O software Rotor-Gene Q faz a interpolação dos sinais de fluorescência entre quaisquer dois valores registrados. Os valores de C_T podem, portanto, ser quaisquer números reais (não limitado a números inteiros) contidos no intervalo de 0 a 40. Para o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, o valor limite está configurado como 0,075 unidades de fluorescência relativa para o canal Green (FAM) e como 0,02 para o canal Yellow (HEX). Esses valores são configurados automaticamente no *therascreen* EGFR Assay Package. Os controles da execução (PC, NTC e IC) são avaliados para garantir que valores aceitáveis de C_T estejam presentes e que as reações estejam funcionando corretamente.

Os valores de ΔC_T das amostras são calculados, para cada ensaio de mutação, usando a equação:

$$\Delta C_T = [\text{valor de } C_T \text{ do ensaio de mutação}] - [\text{valor de } C_T \text{ do ensaio de controle}]$$

As amostras são classificadas como sendo positivas quanto a mutação se tiverem um ΔC_T dentro do intervalo de cut-off de ΔC_T desse ensaio. Acima do intervalo de cut-off de ΔC_T , a amostra poderá conter menos do que a porcentagem de mutação capaz de ser detectada pelo *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (além do limite dos ensaios) ou a amostra poderá ser negativa quanto a mutação, o que seria indicado como "No Mutation Detected" (Nenhuma mutação detectada). Abaixo do intervalo de cut-off de ΔC_T , a amostra seria reportada como "Invalid" (Inválido).

A ausência de amplificação nas reações de mutação será classificada como "No Mutation Detected" (Nenhuma mutação detectada). Os valores de ΔC_T calculados a partir da amplificação de fundo são supostamente superiores ao limite superior de cut-off do intervalo de cut-off de ΔC_T e a amostra é classificada como "No Mutation Detected" (Nenhuma mutação detectada).

Os resultados do ensaio são exibidos como "Mutation Detected" (Mutação detectada), "No Mutation Detected" (Nenhuma mutação detectada), "Invalid" (Inválido) ou, se um controle da execu o falhar, "Run Control Failed" (Falha de controle de execu o). Para as amostras positivas quanto a mutação, são relatadas as muta es específicas. Um tumor poderá conter mais do que uma muta o. Nesses casos, será relatada mais do que uma muta o.

Sinalizadores do Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package

A Tabela 8 (próxima página) exibe uma lista dos possíveis sinalizadores que podem ser gerados pelo Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package, os respectivos significados e as ações que devem ser adotadas.

Os nomes dos sinalizadores são criados de forma a fornecer informações sobre o componente afetado do kit, a amostra ou o controle afetado e a modalidade de falha.

Por exemplo:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = o ensaio de controle (CTRL_ASSAY) do controle positivo (Positive Control, PC) falhou (FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = o controle interno (INT_CTRL) do controle sem modelo (No Template Control, NTC) falhou (FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = o ensaio de controle (CTRL) da amostra (SAMPLE) possui alta concentração (HIGH_CONC).

Tabela 8. Sinalizadores, significados e ações que devem ser adotadas

Sinalizador	Significado	Ação
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Execução de PCR inválida – C_T de FAM fora do intervalo para o controle positivo na reação de controle.	Repita toda a execução de PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Execução de PCR inválida – C_T de FAM fora do intervalo para uma ou mais reações de controle de mutação.	Repita toda a execução de PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Execução de PCR inválida – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle positivo (mistura de reação de controle).	Repita toda a execução de PCR prestando especial atenção às etapas de mistura.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Execução de PCR inválida – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle positivo (mistura de reação de mutação).	Repita toda a execução de PCR prestando especial atenção às etapas de mistura.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Execução de PCR inválida – controle interno acima do intervalo para o controle negativo.	Repita toda a execução de PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Execução de PCR inválida – controle interno abaixo do intervalo para o controle negativo.	Repita toda a execução de PCR.
NTC_INVALID_CT	Execução de PCR inválida – FAM inválido (inferior ao limite) para o controle negativo.	Repita toda a execução de PCR prestando especial atenção às etapas de mistura.
NTC_INVALID_DATA	Execução de PCR inválida – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle negativo.	Repita toda a execução de PCR prestando especial atenção às etapas de mistura.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Amostra inválida – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle da amostra.	Prepare uma nova execução de PCR para repetir a(s) amostra(s) relevante(s) prestando especial atenção às etapas de mistura.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Amostra inválida – C_T de FAM muito baixo no controle da amostra.	Dilua a amostra para aumentar o valor do C_T de controle. Essa diluição deve ser calculada assumindo que diluindo 1:1 com a água fornecida no kit aumentará o C_T em 1,0; quando a amostra estiver diluída, prepare uma nova execução de avaliação de mutações para repetir a amostra. Ou, se a amostra tiver sido diluída após a execução de avaliação de amostras de DNA, avance diretamente para a execução de detecção de mutações do EGFR com a amostra diluída.

A tabela continua na próxima página

Continuação da tabela da página anterior

Sinalizador	Significado	Ação
SAMPLE_CTRL_FAIL	Amostra inválida – C_T de FAM muito alto na reação de controle da amostra.	Prepare uma nova execução de PCR para repetir a amostra. Se a amostra for inválida na repetição da execução de PCR e se a quantidade de DNA continuar sendo insuficiente, extraia mais duas secções de tecido FFPE, se disponível. Prepare uma nova execução de PCR para testar essa extração. Se a amostra for inválida, repita a execução de PCR na segunda extração. Se a amostra não tiver um resultado válido após essa execução, um estado de mutação indeterminado é atribuído à amostra e não devem ser efetuados mais testes.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C_T muito alto (ou sem C_T) para o controle interno (HEX), canal FAM negativo quanto a mutação.	Para as amostras que geram um sinalizador SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID com uma mutação detectada (ou não detectada) em uma mistura de reação de mutação clinicamente relevante – relate os resultados, não é preciso efetuar mais testes. Dilua a amostra com a água fornecida no kit assumindo que diluindo 1:1 aumentará o C_T da reação de controle em 1,0, garantindo que o volume final será > 40 µl (por exemplo, 40 µl de DNA e 40 µl de água do tubo marcado Dil). Prepare uma nova execução de PCR para repetir a amostra. Se inválida na repetição da execução de PCR, extraia a amostra de outras duas secções FFPE. Prepare uma nova execução de PCR para testar essa extração. Se a segunda extração for inválida, dilua como descrito acima. Se a amostra não tiver um resultado válido após essa execução, um estado de mutação indeterminado é atribuído à amostra e não devem ser efetuados mais testes.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Tubo de mutação inválido – C_T de HEX muito baixo para a amostra (controle interno)	Para as amostras que geram um sinalizador SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID com uma mutação detectada (ou não detectada) em uma mistura de reação de mutação clinicamente relevante – relate os resultados, não é preciso efetuar mais testes. Prepare uma nova execução de PCR para repetir a amostra. Se a repetição da execução de PCR for inválida, extraia mais duas secções de tecido FFPE, se disponível. Prepare uma nova execução de PCR para testar essa extração. Se for inválida, repita a execução de PCR na segunda extração. Se a amostra não tiver um resultado válido após essa execução, um estado de mutação indeterminado é atribuído à amostra e não devem ser efetuados mais testes.

A tabela continua na próxima página

Continuação da tabela da página anterior

Sinalizador	Significado	Ação
SAMPLE_INVALID_DATA	<p>Tubo de mutação inválido – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle interno.</p>	<p>Para as amostras que geram um sinalizador SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID com uma mutação detectada (ou não detectada) em uma mistura de reação de mutação clinicamente relevante – relate os resultados, não é preciso efetuar mais testes.</p> <p>Prepare uma nova execução de PCR para repetir a amostra. Se a repetição da execução de PCR for inválida, extraia mais duas secções de tecido FFPE, se disponível. Prepare uma nova execução de PCR para testar essa extração. Se for inválida, repita a execução de PCR na segunda extração. Se a amostra não tiver um resultado válido após essa execução, um estado de mutação indeterminado é atribuído à amostra e não devem ser efetuados mais testes.</p>
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	<p>Uma ou mais mutações de uma amostra são positivas e, ao mesmo tempo, uma ou mais mutações da mesma amostra são inválidas.</p>	<p>Para as amostras que geram um sinalizador SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID com uma mutação detectada (ou não detectada) em uma mistura de reação de mutação clinicamente relevante – relate os resultados, não é preciso efetuar mais testes.</p> <p>Para as amostras que geram um sinalizador SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID com um resultado INVALID (Inválido) obtido em uma mistura de reação de mutação clinicamente relevante, teste novamente a amostra com todas as misturas de reação seguindo a ação específica de sinalizador inválido.</p> <p>Se um sinalizador SAMPLE_INT_CTRL_FAIL for gerado em combinação com outro sinalizador para a amostra afetada, então deve ser seguida a ação de diluição da amostra do sinalizador SAMPLE_INT_CTRL_FAIL. Prepare uma nova execução de PCR e teste novamente a amostra.</p> <p>Para as amostras que geram um sinalizador SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID com um resultado INVALID (Inválido) obtido em uma mistura de reação de mutação clinicamente relevante na execução da repetição da PCR, extraia a amostra de outras duas secções FFPE. Prepare uma nova execução de PCR com todas as misturas de reação para testar essa extração.</p> <p>Se essa amostra produzir novamente um resultado inválido para uma mistura de reação de mutação clinicamente relevante, repita a amostra com todas as misturas de reação seguindo a ação específica de sinalizador inválido. Se SAMPLE_INT_CTRL_FAIL for gerado em combinação com outro sinalizador para a amostra afetada, então deve ser seguida a ação de diluição da amostra do sinalizador SAMPLE_INT_CTRL_FAIL. Prepare uma nova execução de PCR e teste novamente essa amostra.</p> <p>Se o sinalizador SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Amostra positiva e inválida) for observado após esta repetição, será atribuído um estado de mutação indeterminado à amostra.</p>

A tabela continua na próxima página

Continuação da tabela da página anterior

Sinalizador	Significado	Ação
MUTATION_EARLY_CT	Amostra inválida — ΔC_T muito baixo ou C_T abaixo do intervalo de cut-off	Prepare uma nova execução de PCR para repetir a amostra relevante prestando especial atenção às etapas de mistura.

Guia de solução de problemas

Este guia de solução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de Perguntas frequentes (Frequently Asked Questions, FAQ) no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre disponíveis para responder a quaisquer questões que você possa ter sobre as informações e os protocolos contidos neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para obter informações de contato, consulte o verso do manual ou acesse www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

Amostras de NTC apresentam resultados positivos no canal Green FAM

Ocorreu contaminação durante o preparo da PCR

Repita a PCR com novos reagentes nas réplicas.

Se possível, feche os tubos de PCR diretamente após adicionar a amostra a ser testada.

Certifique-se de que o local de trabalho e os instrumentos sejam descontaminados regularmente.

Nenhum sinal com o controle positivo do EGFR

a) O canal de fluorescência selecionado para a análise de dados de PCR não atende ao protocolo.

Para a análise de dados, selecione o canal de fluorescência Cycling Green para a PCR analítica do EGFR e o canal de fluorescência Cycling Yellow para a PCR do controle interno.

b) Programação incorreta do perfil de temperatura do instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Compare o perfil de temperatura com o protocolo. Se for incorreto, repita a execução.

Comentários e sugestões

c) Configuração incorreta da PCR	Verifique os seus passos de trabalho com relação ao esquema de pipetagem e repita a PCR, caso seja necessário.
d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em "Armazenamento e manuseio de reagentes" (página 18)	Verifique as condições de armazenamento e a data de validade dos reagentes (veja o rótulo do kit) e, se necessário, use um novo kit.
e) A data de validade do <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit expirou	Verifique as condições de armazenamento e a data de validade dos reagentes (veja o rótulo do kit) e, se necessário, use um novo kit.

Controle de qualidade

Em conformidade com o Sistema de Gestão de Qualidade da QIAGEN certificado pela ISO, cada lote do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit é testado com relação a especificações predeterminadas para garantir a qualidade consistente do produto.

Limitações

Os resultados do produto devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e laboratoriais relevantes e não devem ser usados para diagnóstico de forma isolada.

O produto deve ser usado apenas por pessoal devidamente treinado e especializado em procedimentos de diagnóstico *in vitro* e em instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

O produto destina-se a uso exclusivo em um ciclador de real-time PCR do Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Para obter resultados otimizados, deve-se observar rigorosamente o *Manual do theascreen EGFR RGQ PCR Kit*. Não é recomendável diluir os reagentes de forma diferente à descrita neste manual, já que pode ocorrer uma diminuição do desempenho.

É importante que a quantidade e qualidade do DNA na amostra seja avaliada antes de se efetuar a análise de amostras com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. É fornecida uma Mistura de reação de controle adicional para determinar se o valor de C_T é aceitável para o ensaio. As leituras de absorvância não devem ser usadas, pois não se correlacionam aos valores de C_T em amostras de DNA fragmentado.

Os primers na mistura de reação de deleções do EGFR foram concebidos tendo como alvo múltiplas deleções do éxon 19, abrangendo os nucleotídeos 55174772 a 55174795 (GRCh38 chr7), um intervalo de 23 bp.

Embora o ensaio de deleções do éxon 19 tenha sido analiticamente validado e tenha demonstrado a capacidade para detectar 14 deleções específicas no éxon 19 (consulte a lista na Tabela 1 deste manual), é possível, entretanto, que mutações adicionais (incluindo, entre outras, deleções adicionais do éxon 19, inserções do éxon 19 e a mutação L747P) sejam amplificadas pelo Conjunto de primers de deleção.

Se estiverem presentes, essas mutações adicionais darão origem a um resultado "Deletions Detected" (Deleções detectadas) para uma dada amostra de paciente.

Além disso, é possível que a mutação L858Q seja detectada pelo ensaio L858R. Portanto, se estiver presente em uma amostra de paciente, a mutação L858Q poderá dar origem a um resultado "L858R Detected" (L858R detectada).

Deve-se prestar atenção às datas de validade e às condições de armazenamento impressas na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não use componentes cuja data de validade tenha expirado nem que tenham sido incorretamente armazenados.

Características de desempenho

Desempenho analítico

As características de desempenho específicas do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit foram determinadas por estudos que usaram espécimes de tecido FFPE coletados de pacientes com CPCNP e linhas celulares humanas FFPE (linhas celulares FFPE). As linhas celulares FFPE foram geradas usando uma linha celular de carcinoma pulmonar (A549) para produzir linhas celulares contendo as mutações do EGFR específicas pretendidas. Quando não estavam disponíveis espécimes de tecido ou linhas celulares, foi usado DNA plasmídico.

Limite de branco (Limit of Blank, LOB), intervalo de trabalho, valores de cut-off e intervalos de cut-off de ΔC_T

Foi testado um total de 417 amostras FFPE em um estudo que segue as indicações da diretriz NCCLS EP17-A (2004) (12) para determinar o LOB e os valores de cut-off de ΔC_T de cada ensaio de mutação. Além disso, foi determinado o intervalo de trabalho. Os intervalos de cut-off de ΔC_T são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Intervalos de cut-off de ΔC_T estabelecidos para cada ensaio de mutação

Ensaio	Intervalo de C_T	Intervalo de cut-off de ΔC_T (ΔC_T)
T790M	0,00 a 40,00	-10,00 \geq a \leq 7,40
Deleções	0,00 a 40,00	-10,00 \geq a \leq 8,00
L858R	0,00 a 40,00	-10,00 \geq a \leq 8,90
L861Q	0,00 a 40,00	-10,00 \geq a \leq 8,90
G719X	0,00 a 40,00	-10,00 \geq a \leq 8,90
S768I	0,00 a 40,00	-10,00 \geq a \leq 8,90
Inserções	0,00 a 40,00	-10,00 \geq a \leq 8,00

O intervalo de C_T da reação de controle foi estabelecido como sendo um C_T entre 23,70 e 31,10.

Os valores de cut-off e intervalos de trabalho do ensaio foram verificados usando padrões e outras amostras FFPE. Durante a verificação, os cut-offs foram avaliados para verificar a capacidade de distinguir a mutação correta em um fundo de DNA de tipo selvagem, avaliando-se cada ensaio com concentração alta de entrada de DNA genômico e concentração alta de entrada de DNA de mutação (consulte Reatividade cruzada). O efeito da entrada de DNA na determinação da mutação também foi avaliado (consulte Efeito da entrada de DNA em valores de ΔC_T). É introduzido um limite inferior ao intervalo para excluir um artefato de fluorescência de PCR.

Para avaliar o desempenho do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit na ausência de modelo e para assegurar que uma amostra em branco ou uma amostra com DNA de tipo selvagem não gere um sinal analítico que possa indicar uma baixa concentração de mutação, foram avaliadas amostras sem modelo e DNA de tipo selvagem de EGFR de CPCNP. Os resultados demonstraram que não existem determinações de mutação positivas para amostras de NTC e amostras FFPE de tipo selvagem.

Efeito da entrada de DNA em valores de ΔC_T

O nível de entrada de DNA é definido como a quantidade total do DNA de EGFR amplificável em uma amostra, como determinado pelos valores de C_T da reação de controle. Para demonstrar que o desempenho do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit é consistente por todo o intervalo de C_T da reação de controle (23,70 a 31,10), todos os 7 ensaios de mutação do EGFR foram testados com relação a uma série de diluição 1 em 3 de 6 pontos (DNA extraído de linhas celulares FFPE). O C_T -alvo para a diluição 1 para cada mutação foi de aproximadamente 24,70. A diluição final, que produziu um C_T de aproximadamente 32–33, estava fora do intervalo de C_T da reação de controle. Na generalidade, os valores de ΔC_T medidos a diferentes níveis de entrada de DNA total foram consistentes por todo o intervalo de trabalho do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Reatividade cruzada

Foi testado o DNA de tipo selvagem de EGFR a nível alto de entrada de DNA para avaliar a amplificação não específica. Os resultados demonstraram que os valores mais baixos de ΔC_T ultrapassaram os cut-offs estabelecidos, indicando a não existência de amplificação não específica.

Foram testadas linhas celulares FFPE a nível alto de entrada de DNA com relação a todas as misturas de reação para avaliar a reatividade cruzada potencial. Os resultados demonstraram que não existe nenhum impacto devido a reatividade cruzada entre reações mutantes. Os valores mínimos de ΔC_T foram todos superiores aos respectivos valores de cut-off do ensaio para todas as amostras de DNA e misturas de reação não correspondentes.

Exatidão: Comparação com o método de referência analítica

Um estudo demonstrou a concordância na detecção de mutações do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit com relação ao sequenciamento bidirecional de Sanger. Neste estudo, foram testadas 360 amostras FFPE.

Foram analisadas amostras com resultados válidos tanto por Sanger quanto pelo *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, para avaliar a concordância na percentagem de positivos (Positive Percent Agreement, PPA), a concordância na percentagem de negativos (Negative Percent Agreement, NPA) e a concordância na percentagem global (Overall Percent Agreement, OPA). Essas percentagens, juntamente com os intervalos de confiança (IC) de 95% bilaterais correspondentes, estão resumidas na Tabela 10.

Tabela 10. Análise de concordância

Medição	Concordância percentual (N)	IC de 95%
Concordância na percentagem de positivos	99,4% (157/158)	96,5%–100,0%
Concordância na percentagem de negativos	86,6% (175/202)	81,2%–91,0%
Concordância na percentagem global	92,2% (332/360)	89,0%–94,8%

Para os 28 resultados discordantes da concordância na percentagem global:

- 1 amostra (3,6%) era de tipo selvagem (ou seja, nenhuma mutação detectada) pelo *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, mas teve resultados de mutação detectada por sequenciamento de Sanger.
- 27 amostras (96,4%) tiveram mutação detectada pelo *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, mas tiveram resultados de tipo selvagem por sequenciamento de Sanger.

Valores de limite de detecção (Limit of Detection, LOD)

Um estudo foi efetuado para determinar o LOD de cada uma das 29 mutações do EGFR. O LOD foi definido como a menor quantidade de DNA mutante em um fundo de DNA de tipo selvagem com o qual uma amostra mutante produzirá resultados positivos quanto a mutação em 95% dos resultados de teste (C_{95}).

Para determinar o LOD de cada mutação, amostras com diferentes percentagens de mutação em concentrações baixa e alta de entrada de DNA foram preparadas e testadas com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (Tabela 11). O LOD de cada ensaio foi calculado por regressão logística. Para verificar o LOD, foram testadas amostras de mutação no LOD determinado e foi verificada a taxa de testes positivos.

Tabela 11. O LOD estabelecido usando espécimes clínicos FFPE a um nível baixo e alto de entrada de DNA, linhas celulares FFPE ou plasmídeos

Éxon	Mutação	ID COSMIC*	Mudança de base	LOD (% mutante)	
				Baixa	Alta
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [‡]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [‡]	– [¶]
19	Deleções	12384	2237_2255>T	1,58 [§]	0,49 [§]
		12387	2239_2258>CA	4,91 [†]	1,48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16,87 [†]	12,47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3,24 [†]	1,65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4,24 [†]	1,41 [†]
		12678	2237_2251del15	0,55 [§]	0,24 [§]
		6218	2239_2247del9	8,47 [†]	– [¶]
		12728	2236_2253del18	2,43 [†]	– [¶]
		12367	2237_2254del18	2,72 [†]	– [¶]
		6210	2240_2251del12	4,09 [†]	– [¶]
		6220	2238_2255del18	2,70 [†]	0,82 [†]
		6223	2235_2249del15	6,40 [†]	1,63 [†]
		6225	2236_2250del15	2,80 [†]	1,42 [†]
		6254	2239_2253del15	0,86 [§]	0,47 [§]
		6255	2239_2256del18	0,14 [§]	0,05 [§]
		12369	2240_2254del15	4,94 [§]	1,56 [§]
		12370	2240_2257del18	8,10 [§]	2,08 [§]
12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0,25 [§]	0,10 [§]		
12383	2239_2251>C	4,58 [§]	1,74 [§]		

A tabela continua na próxima página

Continuação da tabela da página anterior

Éxon	Mutação	ID COSMIC*	Mudança de base	LOD (% mutante)	
				Baixa	Alta
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Inserções	12376	2307_2308insGCCAGCGT G	11,61 [†]	- [‡]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [†]	1,31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [†]	0,65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9,72 [†]	5,09 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [†]	1,13 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [†]	0,66 [†]

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (Catálogo de mutações somáticas no câncer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

[†] Os valores de LOD foram estabelecidos usando linhas celulares.

[‡] Os valores de LOD foram estabelecidos usando plasmídeos.

[§] Os valores de LOD foram estabelecidos usando amostras clínicas.

[¶] Não avaliado

Interferência

Efeitos de tecido necrótico

Os espécimes clínicos FFPE de CPCNP com conteúdo de tecido necrótico até 50%, para espécimes de tipo selvagem e mutantes do EGFR, não interferiram com os resultados de determinações do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Substâncias exógenas

Foram testadas substâncias potencialmente interferentes presentes no processo de extração de DNA em amostras de tipo selvagem e mutantes a uma concentração de 10x: cera de parafina, xileno, etanol e proteinase K. Os resultados demonstraram que estas substâncias não interferiram com os resultados das determinações do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Reprodutibilidade

Reprodutibilidade lote a lote

O sistema de testes do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit usa dois kits: o QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ou o QIAamp DNA FFPE Tissue Kit para o isolamento do DNA e o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit para a amplificação do DNA e a detecção do status de mutação do EGFR. A permutabilidade e reprodutibilidade lote a lote foram demonstradas usando 3 lotes do QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit e 3 lotes do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. A porcentagem geral de determinações corretas em todos os lotes para o ensaio de mutação do EGFR foi de 97,8% (317/324) e a porcentagem para amostras de tipo selvagem foi de 100% (379/379).

Manuseio de espécimes

A reprodutibilidade do QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit foi examinada usando seções tiradas de três blocos de espécimes FFPE, especificamente de um espécime de mutação de deleção do éxon 19 (2235-2249 del15), um espécime de mutação L858R do éxon 21 e um espécime de tipo selvagem. Para cada espécime, extrações foram realizadas em duplicado em três locais e testadas em três dias não consecutivos por um período de seis dias, produzindo um total de 18 pontos de dados por espécime. Em cada local, 2 operadores efetuaram os testes usando um lote do QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (1 lote por local, 3 lotes no total) em combinação com o mesmo lote dos reagentes do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit em todos os locais.

Todos os resultados de espécimes de tipo selvagem e mutantes foram válidos e produziram o resultado de determinação previsto (determinação correta = 100%, 18/18 para cada espécime), suportando a reprodutibilidade e repetibilidade do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit na etapa pré-analítica do isolamento do DNA.

Exatidão e reprodutibilidade

A exatidão e reprodutibilidade do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit foi investigada testando o DNA extraído de espécimes clínicos FFPE de CPCNP ou linhas celulares FFPE, representando todos os sete ensaios de mutação do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Espécimes clínicos FFPE de tipo selvagem de CPCNP (Tabela 12) também foram incluídos no estudo.

Foi implementado um design de estudo matriz para avaliar a reprodutibilidade do ensaio efetuando testes em amostras em 3 laboratórios (locais), com 3 lotes de *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (3 lotes nos 3 locais), usando 2 operadores por local, em 2 equipamentos por local, com cada amostra (preparada a um nível perto do LOD) testada em duplicado, por um período total de 16 dias. A reprodutibilidade de cada mutação individual foi realizada durante dias não consecutivos em cada local. A proporção das determinações corretas é exibida na Tabela 12, na próxima página.

Tabela 12. Reprodutibilidade do ensaio – Proporção de determinações corretas das mutações do EGFR testadas

Éxon	Mutação	ID COSMIC*	Determinações		% de corretas IC de 95% unilateral inferior
			Corretas/total	% de corretas	
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06
19	Deleções	12384	92/92	100	96,80
		12387	95/95	100	96,90
		12419	83/83	100	96,46
		12422	94/94	100	96,86
		13551	95/95	100	96,90
		6220	96/96	100	96,93
		6223	95/95	100	96,90
		6225	91/95	95,79	90,62
		6254	92/92	100	96,80
		6255	94/96	97,92	93,59
		12369	95/95	100	96,90
		12370	62/63	98,41	92,69
		12382	92/95	96,84	92,04
		12383	93/93	100	96,83
20	S768I	6241	82/82	100	96,41
		Inserções	12376	92/92	100
		12378	93/93	100	96,83
		12377	94/94	100	96,86
	T790M	6240	92/92	100	96,80
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48
	L861Q	6213	84/84	100	96,50
Tipo selvagem	—	—	77/78	98,72	94,06

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (Catálogo de mutações somáticas no câncer); <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Foi usada uma análise dos componentes de variação para estimar o desvio padrão e os intervalos de confiança de 95% para a variabilidade dentro da mesma execução, entre execuções, entre dias, entre lotes e entre locais. Em todos os componentes de variação, o total do coeficiente de variação (Coefficient of Variation, CV) foi $\leq 14,11\%$ para todas as mutações do EGFR testadas. Em todos os membros do painel de mutantes, a porcentagem do CV foi $\leq 8,33\%$ entre lotes, entre dias e entre execuções. A porcentagem do CV para a variabilidade dentro da mesma execução (repetibilidade/exatidão) variou entre 5,99% e 13,49%.

Desempenho clínico

Dados de resultados clínicos: GIOTRIF®

O ensaio clínico LUX-Lung 3 foi um ensaio internacional, multicêntrico, de segmento aberto, randomizado da Fase 3 do afatinib versus quimioterapia como tratamento de primeira linha para pacientes com adenocarcinoma de estágio IIIB ou IV do pulmão contendo uma mutação de ativação do EGFR (ClinicalTrials.gov número NCT00949650). A elegibilidade de um paciente para participação no ensaio foi determinada testando o status de mutação do EGFR do paciente usando o Ensaio de avaliação clínica (Clinical Trial Assay, CTA). Foram realizados testes retrospectivos de espécimes de tecidos usando o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Foi realizado um estudo comparativo para avaliar a concordância entre o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit e o CTA.

Com base nos resultados dos testes do CTA, 345 pacientes ficaram no conjunto randomizado (afatinib: 230 pacientes; quimioterapia: 115 pacientes). O resultado da eficácia primária foi de sobrevida livre de progressão (Progression-Free Survival, PFS) conforme avaliado por uma comissão de avaliação independente (Independent Review Committee, IRC). Entre os 345 pacientes randomizados, foram testadas amostras de tumor de 264 pacientes (afatinib: 178 pacientes; quimioterapia: 86 pacientes) retrospectivamente usando o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Uma melhoria estatística significativa na PFS, conforme determinada pela IRC, foi demonstrada para pacientes randomizados para afatinib quando comparada com a dos pacientes randomizados para quimioterapia, na população geral CTA+ e na população *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+. Os resultados da eficácia geral estão resumidos na Tabela 13 e na Figura 19.

Tabela 13. Benefícios clínicos de pacientes testados com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit na população do ensaio clínico LUX-Lung 3

Parâmetro	População <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ n = 264		População CTA+, n = 345	
	Quimioterapia n = 86	Afatinib n = 178	Quimioterapia n = 115	Afatinib n = 230
Sobrevida livre de progressão (Progression-Free Survival, PFS)				
Número de mortes ou progressões, N (%)	53 (61,6%)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
PFS mediana (meses)	6,9	11,2	6,9	11,1
IC de 95% da PFS mediana	5,3, 8,2	9,7, 13,7	5,4, 8,2	9,6, 13,6
Razão de risco	0,49		0,58	
IC de 95% da razão de risco	0,35, 0,69		0,43, 0,78	
Valor P (teste log-rank estratificado)*	< 0,0001		< 0,001	

* Estratificado por estado de mutação do EGFR e raça.

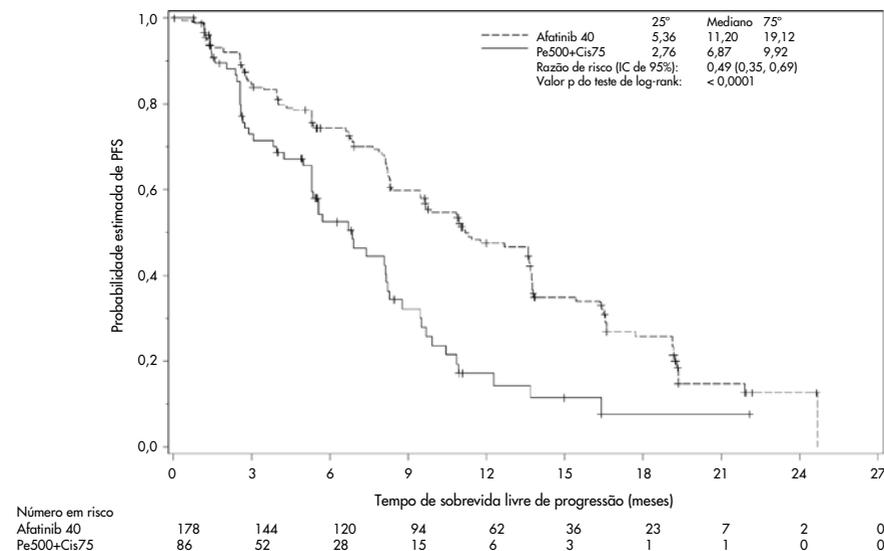


Figura 19. Curva de Kaplan-Meier da sobrevivida livre de progressão (Progression-Free Survival, PFS) por exame independente por grupo de tratamento (população *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+).

A análise do subconjunto *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ (n = 264) revelou que os pacientes tratados com afatinib tiveram um aumento significativo do tempo de PFS (PFS mediana de 11,2 versus 6,9 meses) e são menos propícios a um evento de doença progressiva ou morte (HR = 0,49, IC de 95% [0,35; 0,69], p < 0,0001) do que pacientes tratados com quimioterapia. O benefício clínico observado no subconjunto dos pacientes testados com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit era comparável com o observado na população total do estudo (n = 345).

Dados de resultados clínicos: IRESSA®

O ensaio de medida adicional IRESSA (IFUM) foi um estudo (NCT01203917) de segmento único aberto de fase 4 para caracterizar a eficácia e a segurança/tolerabilidade do gefitinib de primeira linha em pacientes caucasianos com CPCNP de estágio IIIA/B/IV com mutação positiva do EGFR local avançada ou metastática. O estudo IFUM foi concebido para avaliar a taxa de resposta objetiva por critérios RECIST em pacientes caucasianos com CPCNP com mutação do EGFR selecionados prospectivamente.

Os pacientes elegíveis precisariam ter uma deleção no éxon 19 do EGFR, mutação por substituição L858R, L861Q ou G719X e nenhuma mutação T790M ou S768I ou inserções no éxon 20 nos espécimes de tumor, conforme determinado prospectivamente pelo Ensaio de avaliação clínica (Clinical Trial Assay, CTA). Os testes retrospectivos de espécimes de pacientes examinados para a avaliação clínica IFUM foram efetuados usando o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit de diagnóstico complementar. Um estudo comparativo foi realizado para avaliar a concordância do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit com o CTA usado para selecionar pacientes para a avaliação clínica IFUM. A concordância geral entre os dois ensaios para a detecção de deleções do éxon 19 do EGFR e mutação L858R foi de 98,2% (n = 700/713; IC de 95%: 96,9%, 99,0%) com a PPA de 88,2% (n = 90/102; IC de 95%: 80,4%, 93,8%) e com a NPA de 99,8% (n = 610/611; IC de 95%: 99,1%, 100,0%).

Foram obtidos resultados de teste por CTA para 859 pacientes examinados, dos quais 106 pacientes eram elegíveis para tratamento com gefitinib. Das 859 amostras com um resultado CTA, 765 amostras estavam disponíveis para testes retrospectivos com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, incluindo 87 amostras que eram positivas com relação à mutação do EGFR, tanto por CTA quanto pelo *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

O resultado de maior eficácia foi a taxa de resposta objetiva (Objective Response Rate, ORR) conforme avaliado por um Exame independente e imparcial central (Blinded Independent Central Review, BICR) e investigadores. O benefício clínico observado no subconjunto dos pacientes testados com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit era comparável com o observado na população total do estudo.

Os resultados da eficácia geral estão resumidos na Tabela 14.

Tabela 14. Benefícios clínicos de pacientes testados com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit na população da avaliação clínica IFUM

Parâmetro	População <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+, n = 87	População CTA+, n = 106
Taxa de resposta objetiva (Objective Response Rate, ORR) por BICR		
Número de respostas (N)	42	53
ORR, % (IC de 95%)	48,3 (38,1 a 58,6)	50,0 (40,6 a 59,4)
Duração média de resposta (meses)	6,9 (5,6 a 11,4)	6,0 (5,6 a 11,1)
Taxa de resposta objetiva (Objective Response Rate, ORR) por investigadores		
Número de respostas (N)	62	74
ORR, % (IC de 95%)	71,3 (61,0 a 79,7)	69,8 (60,5 a 77,7)
Duração média de resposta (meses)	8,3 (7,2 a 11,3)	8,3 (7,6 a 11,3)

BICR: Exame independente e imparcial central (Blinded independent central review); IC: Intervalo de confiança; CTA: Ensaio de avaliação clínica (Clinical Trial Assay).

Nota: Kit + são resultados positivos para deleções do éxon 19/L8585R/L861Q/G719X.

Dado que o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit não foi usado para selecionar os pacientes para o ensaio clínico IFUM, foram efetuadas análises de eficácia adicionais para considerar pacientes que não estavam incluídos no ensaio porque apresentaram resultados negativos pelo CTA, mas podiam ter apresentado resultados positivos pelo *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (ou seja, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-), bem como pacientes que participaram da avaliação, mas não tiveram resultados válidos de novos testes do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (ou seja, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit desconhecido/CTA+). Os resultados de todas as análises hipotéticas foram geralmente semelhantes aos da análise de eficácia primária.

Referências

1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* 23, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 7525.
3. Inoue, A., et al. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol.* 24, 3340.
4. Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24 (18S) (Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24 (18S) (Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May 3 June 2008. *J. Clin. Oncol.* 26 (15S) (Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* 15, 2442.
8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). *J. Clin. Oncol.* 26 (May 20 suppl), abstr 8038.

-
9. Jaene, P.A. and Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 12, 4416s.
 10. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
 11. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28, 3752.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Símbolos

Os seguintes símbolos podem aparecer na embalagem e no rótulo:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Data de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Referência
	Número de lote
	Número de material
	Proteger da luz
	Número global de item comercial
Rn	R representa a revisão das Instruções de Uso (Manual) e n representa o número de revisão
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consulte as instruções de uso
	Cuidado

Anexo A: protocolo manual do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Esta seção contém instruções para usar o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit com o software Rotor-Gene Q, versão 2.3.5 ou posterior no modo aberto (ou seja, sem usar o Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Informações gerais

- Para obter uma lista dos materiais necessários, consulte Materiais necessários, mas não fornecidos.
- Para obter instruções completas sobre o preparo e a disposição de amostras, consulte Protocolo: avaliação de amostras e Protocolo: detecção de mutações do EGFR.
- Certifique-se de que os parâmetros de ciclagem estejam corretos antes de iniciar cada execução.

Protocolo: criando um perfil de temperatura

Antes de começar, crie um perfil de temperatura para as análises do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Os parâmetros de ciclagem são os mesmos para a avaliação de amostras de DNA e para a detecção de mutações do EGFR.

Procedimento

Um resumo dos parâmetros de ciclagem é exibido na Tabela 15.

Tabela 15. Perfil de temperatura

Ciclos	Temperatura	Tempo	Aquisição de dados
1	95 °C	15 minutos	Nenhuma
40	95 °C	30 segundos	Nenhuma
	60 °C	60 segundos	Green e Yellow

1. Clique duas vezes no ícone do software Rotor-Gene Q Series, 2.3 na área de trabalho do computador conectada ao instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
2. Para criar um novo modelo, selecione Empty Run (Execução vazia) e, em seguida, clique em New (Novo) para acessar o "New Run Wizard" (Assistente de nova execução).
3. Selecione o 72-well rotor (Rotor de 72 poços) como tipo de rotor. Confirme que o anel de travamento está fixado e marque a caixa Locking Ring Attached (Anel de travamento fixado). Clique em Next (Próximo) (Figura 20).

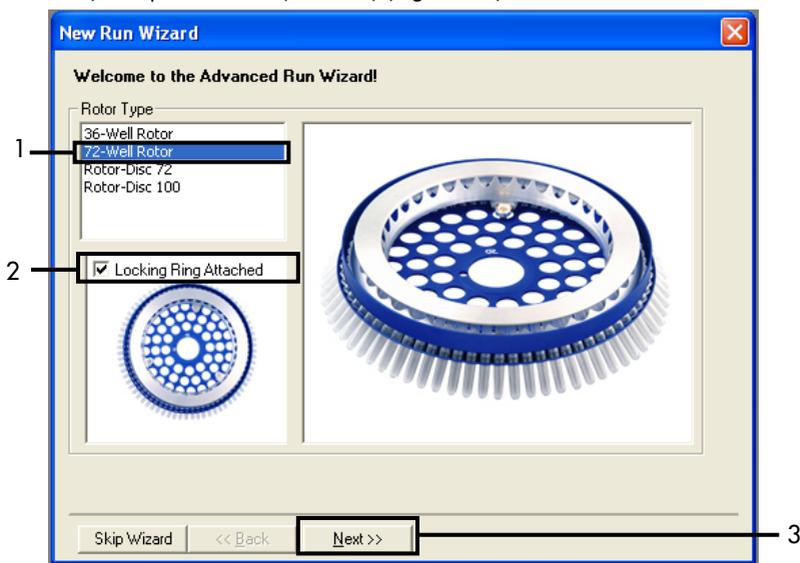


Figura 20. A caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de nova execução). 1 = "Rotor type" (Tipo de rotor); 2 = caixa "Locking Ring Attached" (Anel de travamento fixado); 3 = "Next" (Próximo).

4. Insira o nome do operador. Adicione quaisquer notas desejadas e insira 25 como o volume de reação. Certifique-se de que 1, 2, 3... esteja especificado no campo Sample Layout (Disposição das amostras). Clique em Next (Próximo) (Figura 21).

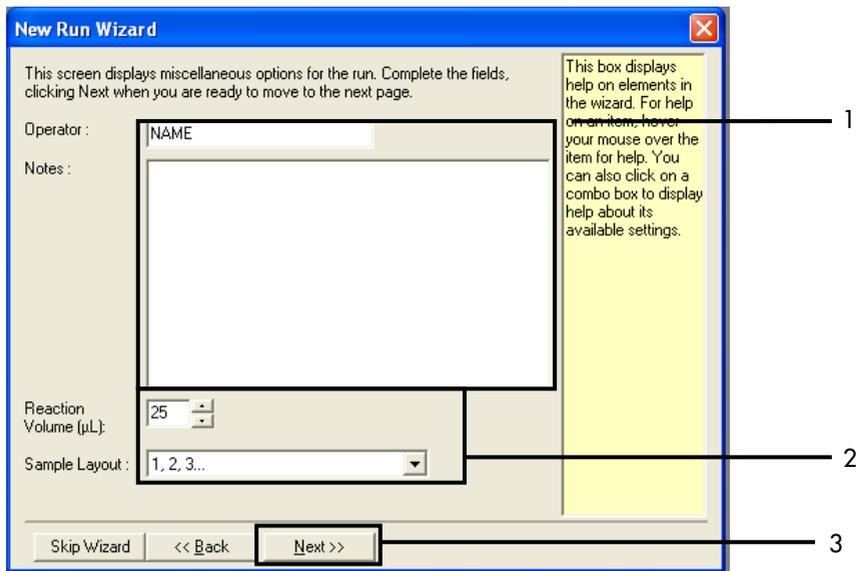


Figura 21. Inserindo o nome do operador e volumes de reação. 1 = campo de diálogo "Operator" (Operador) e campo de diálogo "Notes" (Notas); 2 = campo "Reaction Volume" (Volume de reação) e campo "Sample Layout" (Disposição das amostras); 3 = botão "Next" (Próximo).

5. Clique em Edit Profile (Editar perfil) na caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de nova execução) (Figura 22) e verifique os parâmetros da execução de acordo com as etapas a seguir.



Figura 22. "Edit Profile" (Editar perfil) no "New Run Wizard" (Assistente de nova execução).

6. Clique em Insert after (Inserir após) e selecione New Hold at Temperature (Nova retenção à temperatura) (Figura 23).

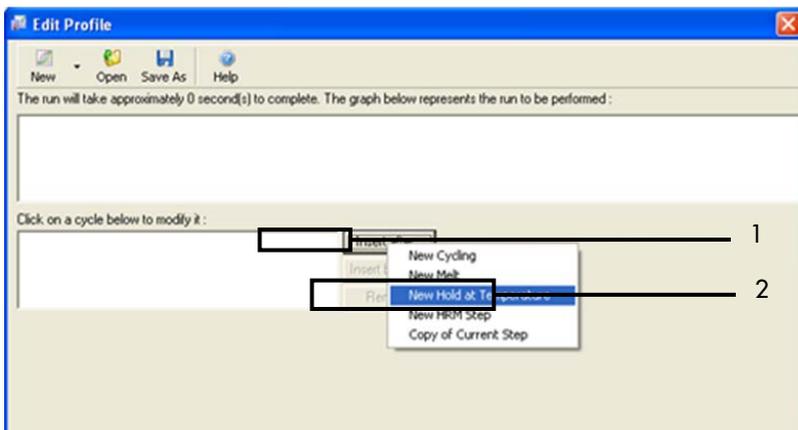


Figura 23. Inserindo uma etapa inicial de incubação. 1 = "Insert after" (Inserir após); 2 = "New Hold at Temperature" (Nova retenção à temperatura).

7. Defina o valor no campo Hold Temperature (Temperatura de retenção) como 95 °C e o valor do campo Hold Time (Tempo de retenção) como 15 mins 0 secs (15 min 0 s). Clique em Insert After (Inserir após) e, em seguida, selecione New Cycling (Nova ciclagem) (Figura 24).

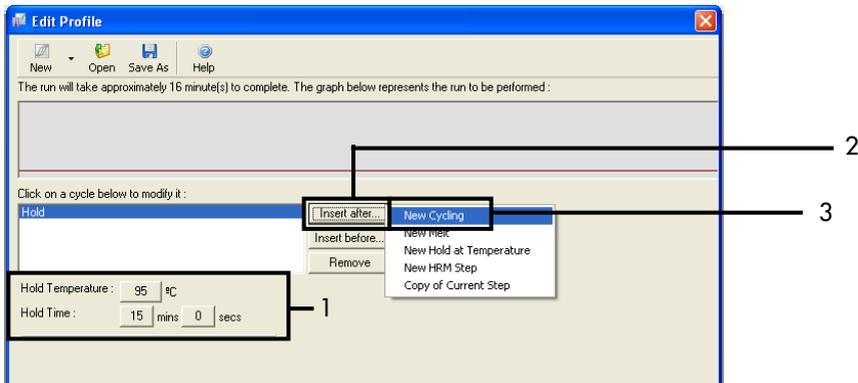


Figura 24. Etapa inicial de incubação a 95 °C. 1 = botões "Hold Temperature" (Temperatura de retenção) e "Hold Time" (Tempo de retenção); 2 = "Insert after" (Inserir após); 3 = "New Cycling" (Nova ciclagem).

8. Defina o número de repetições de ciclo como 40. Selecione a primeira etapa e configure como 95 °C por 30 segundos (Figura 25).

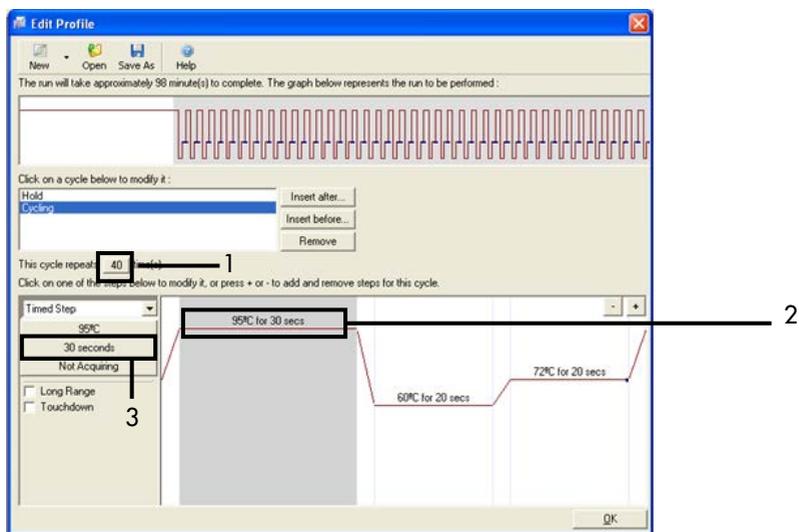


Figura 25. Etapa de ciclagem a 95 °C. 1 = caixa "Cycle repeats" (Repetições de ciclo); 2 = Etapa um: configuração da temperatura; 3 = Etapa um: configuração do tempo.

9. Realce a segunda etapa e configure como 60 °C por 60 segundos. Clique em Not Acquiring (Não adquirir dados) para habilitar a aquisição de dados durante esta etapa (Figura 26).

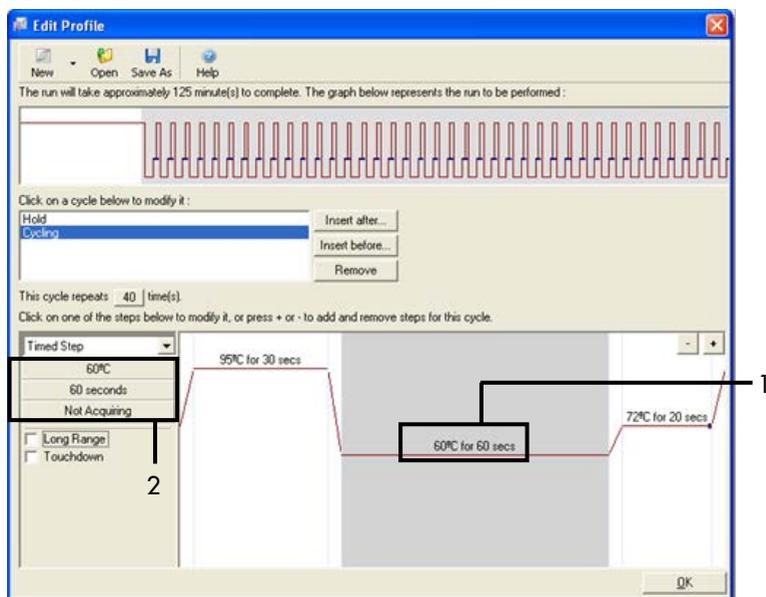


Figura 26. Etapa de ciclagem a 60 °C 1 = Etapa dois: configuração da temperatura e do tempo; 2 = "Not Acquiring" (Não adquirir dados).

10. Selecione Green e Yellow como os canais de aquisição. Clique em > para transferir esses canais da lista Available Channels (Canais disponíveis) para a seção Acquiring Channels (Aquisição de canais). Clique em OK (Figura 27).

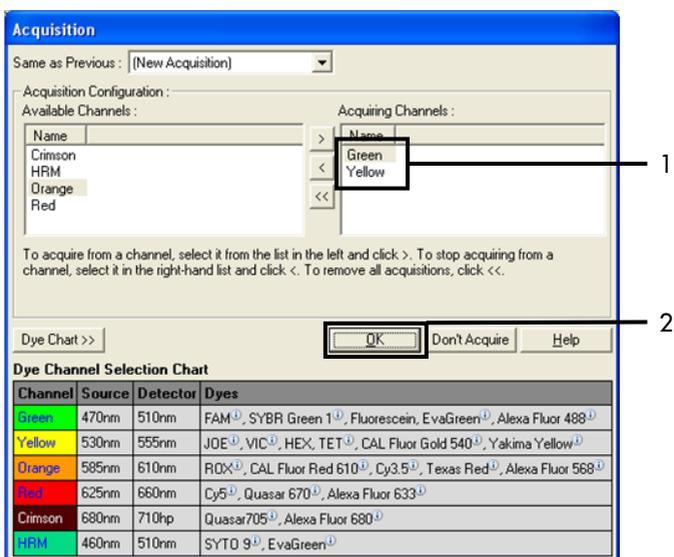


Figura 27. Aquisição de dados na etapa de ciclagem a 60 °C. 1 = Canais selecionados; 2 = "OK".

11. Realce a terceira etapa e clique no botão - para excluir. Clique em OK (Figura 28).

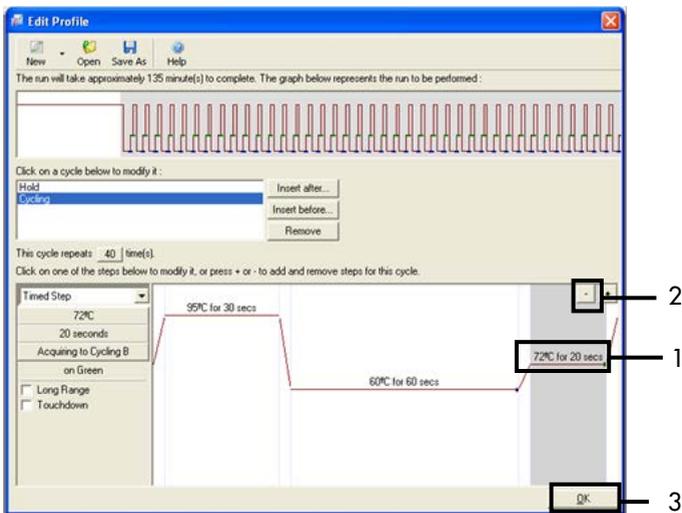


Figura 28. Remoção da etapa de extensão. 1 = Terceira etapa; 2 = Excluir; 3 = "OK".

12. Na próxima caixa de diálogo, clique em Gain Optimisation (Otimização de ganho) (Figura 29).

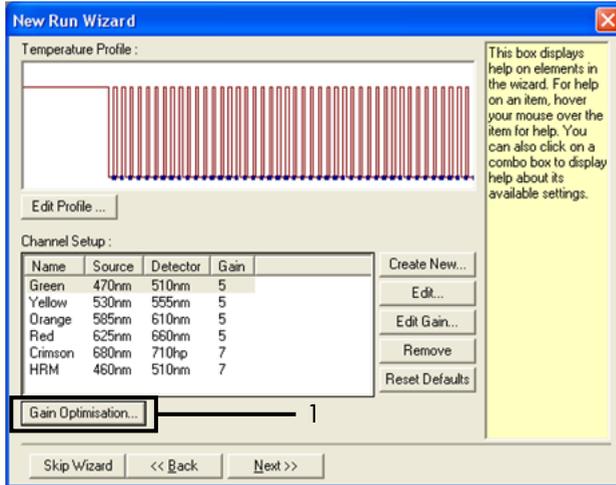


Figura 29. Gain optimisation (1) (Otimização de ganho (1)).

13. Clique em Optimise Acquiring (Otimizar aquisição). As configurações para cada canal são exibidas. Clique em OK para aceitar esses valores padrão para ambos os canais. (Figura 30).

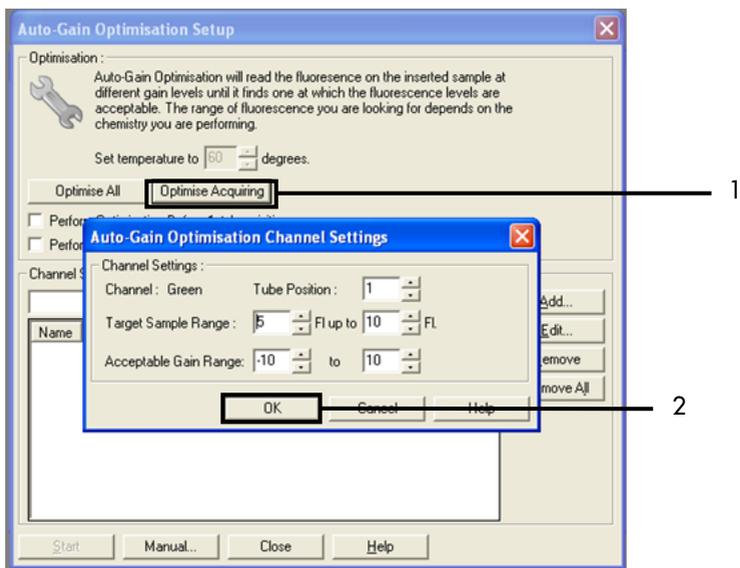


Figura 30. Otimização automática de ganho do canal Green. 1 = "Optimise Acquiring" (Otimizar aquisição); 2 = "OK".

14. Marque a caixa Perform Optimisation before 1st Acquisition (Realizar otimização antes da 1ª aquisição) e, em seguida, clique em Close (Fechar) para voltar ao assistente (Figura 31).

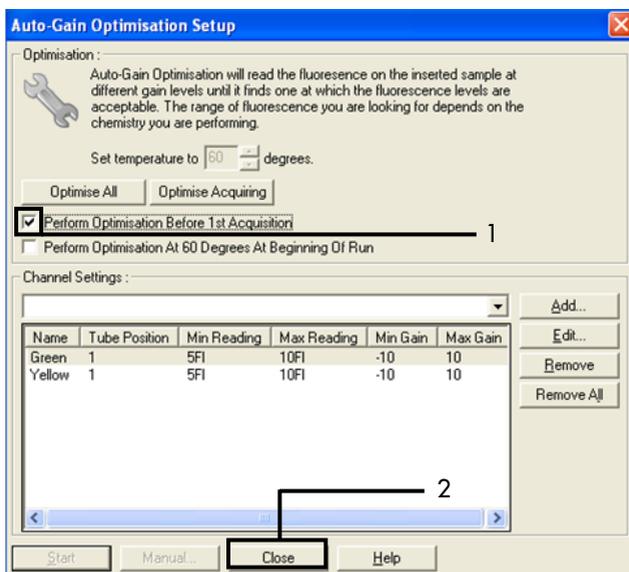


Figura 31. Seleção dos canais Green e Yellow. 1 = caixa de seleção "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Realizar otimização antes da 1ª aquisição); 2 = "Close" (Fechar).

15. Clique em Next (Próximo) (Figura 32). Clique em Save Template (Salvar modelo) para salvar o modelo do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (arquivo *.ret) em uma localização adequada.

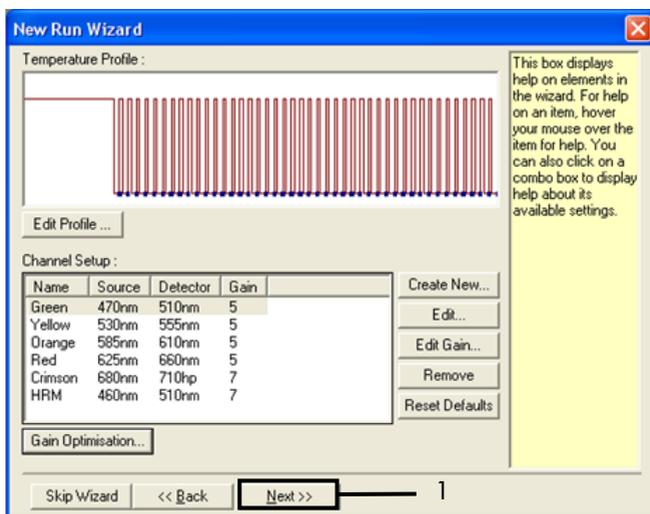


Figura 32. "Next" (Avançar) (1).

Procedimento (Manual)

Protocolo: avaliação de amostras (manual)

Este protocolo é usado para avaliar o DNA amplificável total em amostras e deve ser executado antes da análise de mutação do EGFR.

- Prepare as amostras como descrito na seção Protocolo: avaliação de amostras, até a etapa 11.
- Configure a execução de PCR em um instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, tal como descrito na seção Protocolo: configuração do Rotor-Gene Q do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Após a conclusão da execução, analise os dados de acordo com as instruções na seção Análise de dados de avaliação de amostras.

Protocolo: detecção de mutações do EGFR (manual)

- Após uma amostra ter sido aprovada na avaliação de amostras, ela poderá ser testada para detectar mutações do EGFR.
- Prepare as amostras conforme descrito na seção Protocolo: detecção de mutações do EGFR, até a etapa 11.
- Configure a execução de PCR em um instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, tal como descrito na seção Protocolo: *configuração* do Rotor-Gene Q do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Após a conclusão da execução, analise os dados de acordo com as instruções na seção Análise de dados de detecção de mutações do EGFR.

Protocolo: configuração do Rotor-Gene Q do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Procedimento

1. Abra o software Rotor-Gene Q Series, versão 2.3.5 ou posterior e abra o perfil de temperatura (arquivo *.ret) adequado do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Para obter instruções sobre como criar o perfil de temperatura e verificar os parâmetros de execução, consulte Protocolo: criando um perfil de temperatura.

2. Certifique-se de que o rotor correto esteja selecionado e marque a caixa Locking Ring Attached (Anel de travamento fixado). Clique em Next (Próximo) (Figura 33).

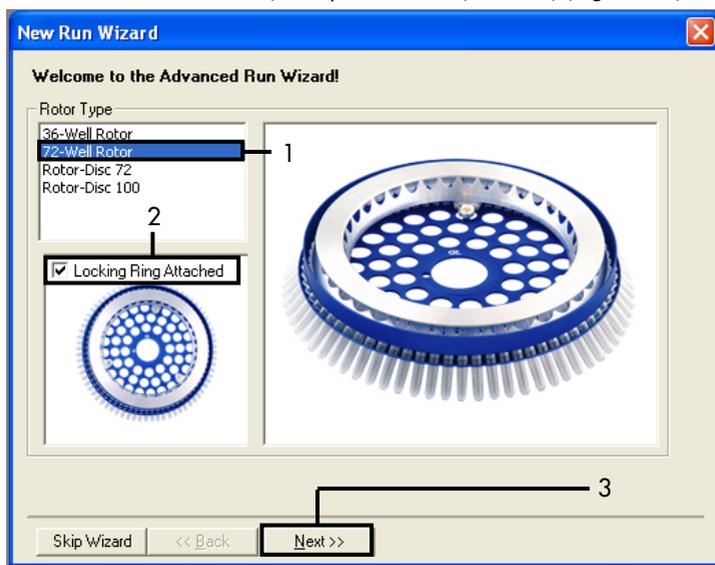


Figura 33. A caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de nova execução) e tela de boas-vindas. 1 = "Rotor type" (Tipo de rotor); 2 = caixa "Locking Ring Attached" (Anel de travamento fixado); 3 = "Next" (Próximo).

3. Insira o nome do operador. Adicione quaisquer notas desejadas, certifique-se de que o volume de reação esteja definido como 25 e que a caixa Sample Layout (Disposição das amostras) exiba 1, 2, 3.... Clique em Next (Próximo) (Figura 34).

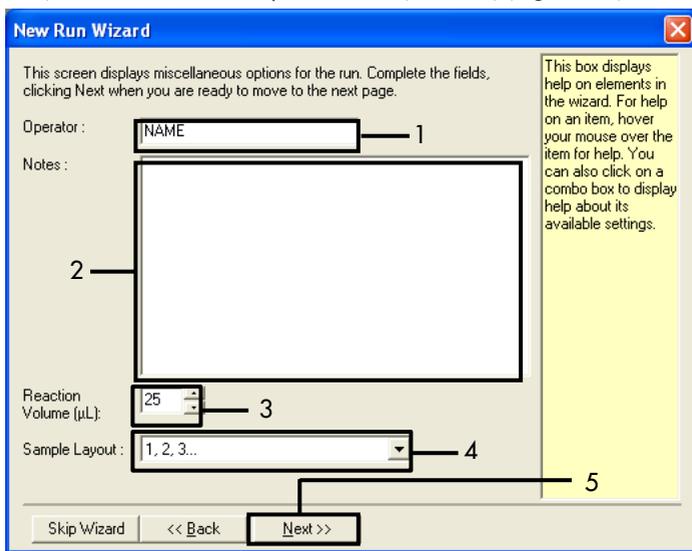


Figura 34. A tela de opções do "New Run Wizard" (Assistente de nova execução). 1 = "Operator" (Operador); 2 = campo "Notes" (Notas); 3 = "Reaction Volume" (Volume de reação); 4 = campo "Sample Layout" (Disposição das amostras); 5 = "Next" (Próximo).

Nota: A janela seguinte permite editar o perfil de temperatura. (Não é necessário editar. O perfil de temperatura foi criado de acordo com as instruções em Protocolo: criando um perfil de temperatura.)

4. Clique em Next (Próximo) (Figura 35).

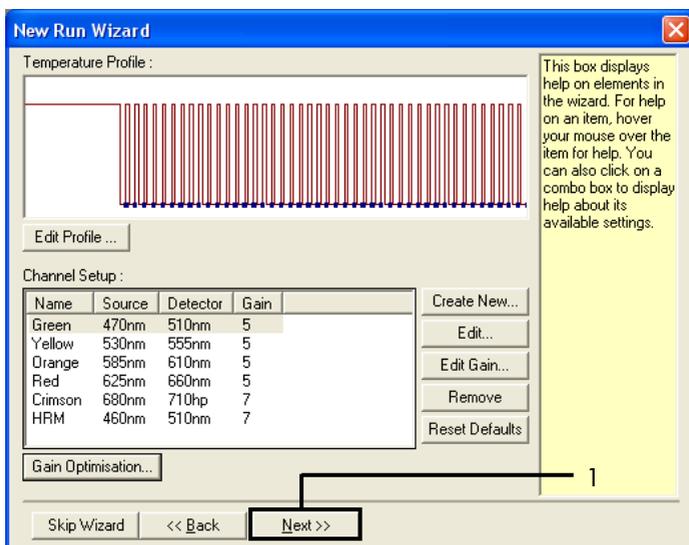


Figura 35. A caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de nova execução) e a tela de edição da temperatura (1 = "Next") (Avançar).

5. Verifique o resumo e clique em Start Run (Iniciar execução) para salvar o arquivo de execução e iniciar a execução (Figura 36).

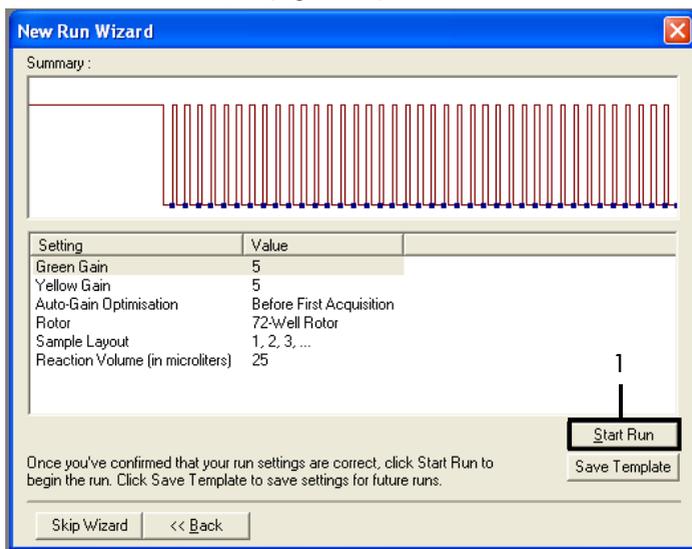


Figura 36. A caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de nova execução) e a tela de resumo (1 = "Start Run") (Iniciar execução).

6. Realize uma das etapas a seguir na janela que aparece após o início da execução:

- Insira os nomes das amostras.
- Clique em Finish (Concluir) e insira os nomes das amostras mais tarde. Para isso, selecione Sample (Amostra) durante a execução ou após a conclusão da execução.

Importante: Se você clicar em Finish and Lock Samples (Concluir e bloquear amostras), não poderá mais editar os nomes das amostras. Tome muito cuidado ao inserir os nomes das amostras, para assegurar que os testes e as análises de amostra estejam corretos.

Nota: Ao nomear amostras, os campos de tubos vazios devem ficar em branco na coluna "Name" (Nome).

7. Após a conclusão da execução, analise os dados de acordo com as seções Análise de dados de avaliação de amostras ou Análise de dados de detecção de mutações do EGFR, conforme for apropriado.

- Se forem necessários relatórios de quantificação, clique no ícone Reports (Relatórios) na barra de ferramentas no arquivo de execução do Rotor-Gene Q.
- No navegador de relatórios, clique em Cycling A Green (page 1) (página 1) em "Report Categories" (Categorias de relatórios) (Figura 37).

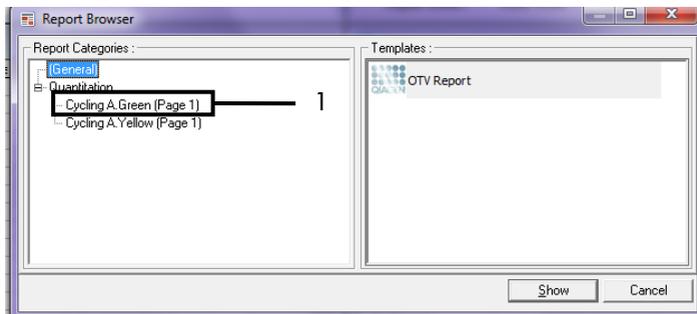


Figura 37. Navegador de relatórios (1 = "Cycling A. Green (page 1) [página 1]").

- Selecione Quantitation (Full Report) (Quantificação [Relatório completo]) em "Templates" (Modelos) (Figura 38).

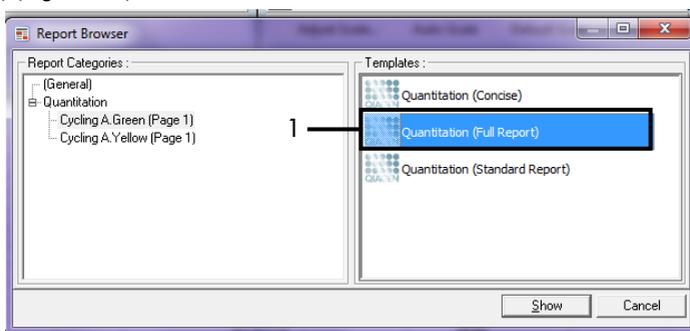


Figura 38. Relatório de quantificação (Relatório completo) (1).

- Para gerar o relatório, clique em Show (Exibir).
- Clique em Save As (Salvar como) para salvar uma versão eletrônica.
- Repita para Cycling A Yellow (Page 1) [página 1].

Interpretação de resultados (Manual)

Após a conclusão da execução do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (para avaliação de amostras de DNA ou para análise de mutação do EGFR), analise os dados de acordo com os procedimentos a seguir:

- Configurações de software para análises
- Análise de avaliação de amostras de DNA (manual)
Nota: Consulte a Tabela 4 para obter mais informações sobre a disposição dos tubos.
- Análise de detecção de mutações do EGFR (manual)
Nota: Consulte a Tabela 7 para obter mais informações sobre a disposição dos tubos.

Configurações de análise do software

1. Abra o arquivo de execução adequado (*.rex) usando o software Rotor-Gene Q Series, versão 2.3.5 ou posterior.
2. Se as amostras não forem nomeadas antes da execução, clique em Edit Samples (Editar amostras).
3. Insira os nomes das amostras na coluna "Name" (Nome).
Nota: Deixe em branco os nomes dos tubos vazios.
4. Clique em Analysis (Análise). Na página de análise, clique em Cycling A Yellow para verificar o canal Yellow (HEX).
5. Clique em Named On (Com nome).
Nota: Isto garante que os tubos vazios não façam parte da análise.
6. Selecione Dynamic tube (Tubo dinâmico).
7. Selecione Slope correct (Correção da inclinação).
8. Selecione Linear scale (Escala linear).

-
9. Selecione Take Off Adj (Aj. de ponto de partida) e insira os valores 15.01 (15,01) na caixa superior ("If take off point was calculated before cycle") (Se o ponto de partida tiver sido calculado antes do ciclo) e 20.01 (20,01) na caixa inferior ("then use the following cycle and take off point") (use o ciclo e o ponto de partida a seguir).
 10. Configure o limiar como 0.02 (0,02) e verifique os valores de C_T do canal Yellow (HEX).
 11. Na página de análise, clique em Cycling A Green para visualizar o canal Green (FAM).
 12. Selecione Named On (Com nome).
 13. Selecione Dynamic tube (Tubo dinâmico).
 14. Selecione Slope correct (Correção da inclinação).
 15. Selecione Linear scale (Escala linear).
 16. Selecione Take Off Adj (Aj. de ponto de partida) e insira os valores 15.01 (15,01) na caixa superior ("If take off point was calculated before cycle") (Se o ponto de partida tiver sido calculado antes do ciclo) e 20.01 (20,01) na caixa inferior ("then use the following cycle and take off point") (use o ciclo e o ponto de partida a seguir).
 17. Configure o limiar como 0.075 (0,075) e verifique os valores de C_T do canal Green (FAM).

Análise de dados de avaliação de amostras

Após a conclusão da execução de avaliação de amostras de DNA, consulte a seção Configurações de análise do software e analise os dados da seguinte forma. (Consulte a Tabela 4, na página 26, para obter mais informações sobre a disposição dos tubos.)

Executar análise de controle

Controle negativo

Para garantir que nenhuma contaminação esteja presente nos modelos, o NTC não deve gerar um valor de C_T abaixo de 40 no canal Green (FAM).

Para garantir que a execução foi configurada corretamente, o NTC deve exibir uma amplificação entre 29,85 e 35,84 no canal Yellow (HEX). Os valores especificados estão dentro e incluem esses valores.

Controle positivo

O PC do EGFR tem de exibir um valor de C_T no canal Green (FAM) entre 28,13 e 34,59. Um valor fora desse intervalo indica um problema na configuração do ensaio. A execução falhou.

Nota: Os dados de amostra não devem ser usados se o controle negativo ou positivo tiver falhado.

Análise de amostras

Se os controles da execução de avaliação de amostras de DNA forem válidos, a análise poderá prosseguir. O valor de C_T de controle de uma amostra deve manter-se no intervalo de 23,70 a 31,10 no canal Green (FAM). Se o C_T da amostra ficar fora desse intervalo, será exibido o seguinte:

- C_T do ensaio de controle de amostras $< 23,70$

As amostras com um C_T de controle $< 23,70$ (concentração alta de DNA) irão sobrecarregar os ensaios de mutação e devem ser diluídas. Para detectar cada mutação a um nível baixo, as amostras muito concentradas são diluídas para ficarem no intervalo de C_T de $23,70$ a $31,10$. Diluir o DNA da amostra aumenta o C_T (uma diluição de 1:1 aumenta o valor do C_T em aproximadamente 1,0). Dilua as amostras usando a água fornecida no kit (Água para diluição [Dil.]).

- C_T do ensaio de controle de amostras $> 31,10$

É recomendável uma nova extração de amostras com um C_T de controle $> 31,10$ no canal Green (FAM). O modelo de DNA inicial presente é insuficiente para detectar todas as mutações do EGFR nos valores de cut-off indicados para o ensaio.

Análise de dados de detecção de mutações do EGFR

Uma amostra deve ser aprovada na avaliação de amostras de DNA para poder ser testada para detecção de mutações do EGFR (consulte Análise de dados de avaliação de amostras).

Após a conclusão da execução de detecção de mutações do EGFR, consulte Configurações de análise do software e analise os dados da seguinte forma. (Consulte a Tabela 7 para obter mais informações sobre a disposição dos tubos.)

Executar análise de controle

Consulte o diagrama de análise de controle da execução na Figura 39.

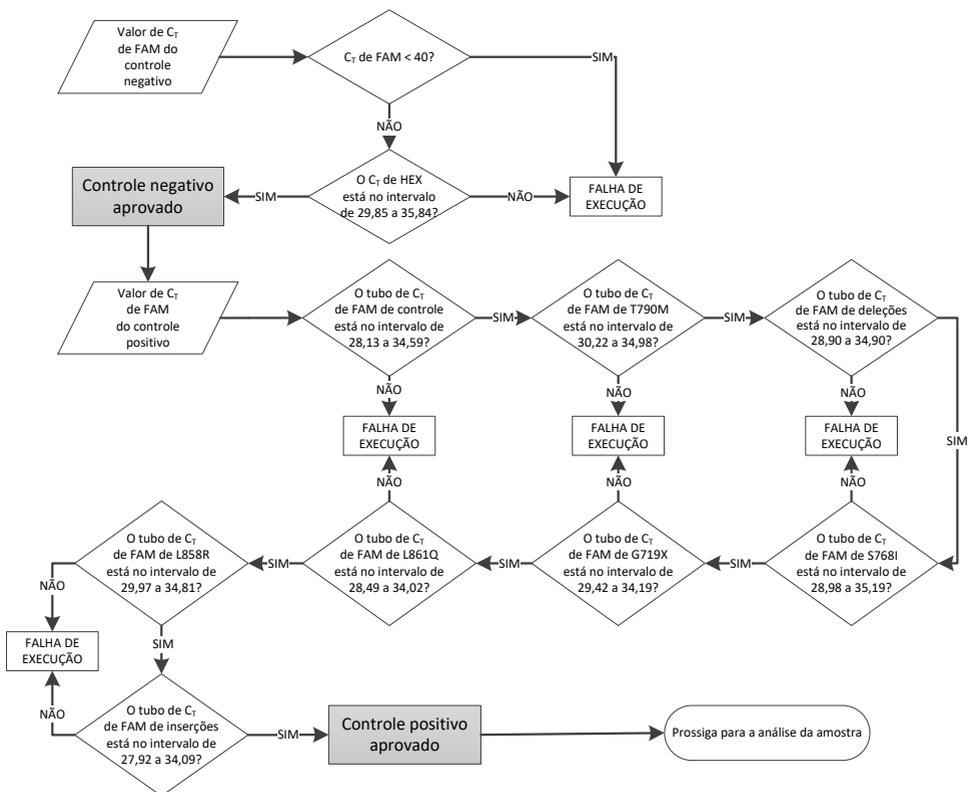


Figura 39. Diagrama de análise de controle da execução para a detecção de mutações do EGFR.

Controle negativo

Para garantir que nenhuma contaminação esteja presente no modelo, o NTC de cada ensaio de mutação do EGFR não deve gerar um valor de C_T abaixo de 40 no canal Green (FAM).

Para garantir que a execução foi configurada corretamente, o NTC deve exibir uma amplificação entre 29,85 e 35,84 no canal Yellow (HEX). Os valores especificados estão dentro e incluem esses valores.

Controle positivo

Para cada ensaio de mutação do EGFR, o PC do EGFR deverá exibir um valor de C_T no canal Green (FAM) dentro do intervalo indicado na Tabela 16. Um valor fora desse intervalo indica um problema na configuração do ensaio. A execução falhou.

Nota: Os dados de amostra não devem ser usados se um dos controles negativos ou positivos da execução falhar.

Tabela 16. Intervalos aceitáveis de C_T dos controles positivos da reação (ensaio de detecção de mutações do EGFR)

Mistura de reação	Amostra	Canal	Intervalo de cut-off de ΔC_T
Controle	PC	Green	28,13–34,59
T790M	PC	Green	30,22–34,98
Deleções	PC	Green	28,90–34,90
L858R	PC	Green	29,97–34,81
L861Q	PC	Green	28,49–34,02
G719X	PC	Green	29,42–34,19
S768I	PC	Green	28,98–35,19
Inserções	PC	Green	27,92–34,09

Análise de amostra – Valor de C_T do canal Green (FAM) de controle da amostra

Se os controles positivo e negativo da execução de detecção de mutação do EGFR forem válidos, a detecção da mutação do EGFR em amostras poderá prosseguir.

O valor de C_T de controle de uma amostra no canal Green (FAM) deve manter-se dentro do intervalo de 23,70 a 31,10. (Consulte a Tabela 7 para obter mais informações sobre a disposição dos tubos.)

Se o C_T de controle da amostra ficar fora desse intervalo, será exibido o seguinte:

- C_T do ensaio de controle de amostras < 23,70

As amostras com um C_T de controle < 23,70 (concentração alta de DNA) irão sobrecarregar os ensaios de mutação e devem ser diluídas. Para detectar cada mutação a um nível baixo, as amostras muito concentradas são diluídas para ficarem no intervalo de C_T de 23,70 a 31,10. Diluir o DNA da amostra aumenta o C_T (uma diluição de 1:1 aumenta o valor do C_T em aproximadamente 1,0). Dilua as amostras usando a água fornecida no kit (Água para diluição [Dil.]).

- C_T do ensaio de controle de amostras > 31,10

É recomendável uma nova extração de amostras com um C_T de controle > 31,10 no canal Green (FAM). O modelo de DNA inicial presente é insuficiente para detectar todas as mutações do EGFR nos valores de cut-off indicados para o ensaio.

Consulte o diagrama de análise de amostra para a detecção de mutações do EGFR na Figura 40.

Análise de amostra – valor de C_T do canal Yellow (HEX) de controle interno da amostra

Nota: Consulte o diagrama de análise de amostra para a detecção de mutações do EGFR na Figura 40.

Todos os tubos de cada amostra devem ser analisados. Verifique se cada tubo gera um sinal HEX no intervalo de 29,85 a 35,84 do controle interno no canal Yellow (HEX). Existem 3 possibilidades.

- Se o C_T de controle interno ficar abaixo do intervalo especificado ($< 29,85$) para qualquer ensaio de mutação, o resultado será inválido para a amplificação do canal Yellow (HEX). A amplificação do canal Yellow (HEX) é inválida para esse tubo.
- Se o C_T de controle interno falhar dentro do intervalo especificado (29,85 a 35,84), o resultado será positivo para a amplificação do canal Yellow (HEX). A amplificação do canal Yellow (HEX) para o tubo é válida.
- Se o C_T de controle interno ficar acima do intervalo especificado ($> 35,84$), o resultado será negativo para a amplificação do canal Yellow (HEX).

Se houver amplificação no canal Green (FAM) e o ΔC_T dessa reação for inferior ou igual ao cut-off do ensaio para esse tubo, a amplificação do canal Yellow (HEX) será válida. Se não houver amplificação no canal Green (FAM) para o tubo ou um valor de ΔC_T superior ao cut-off do ensaio, a amplificação do canal Yellow (HEX) será inválida.

A amplificação do controle interno no canal Yellow (HEX) poderá falhar devido a inibição da PCR. Diluir a amostra poderá reduzir o efeito dos inibidores. Tenha em atenção que essa ação também dilui o DNA-alvo na amostra. Dilua as amostras usando a água fornecida no kit (Água para diluição [Dil.]).

Análise de amostra – Valor C_T do canal Green (FAM) de ensaios de mutação de amostra

Os valores do canal Green (FAM) de todas as sete misturas de reação de mutação do EGFR devem ser comparados aos valores apresentados na Tabela 17. Os valores especificados estão dentro e incluem os valores apresentados. (Consulte a Tabela 7 para obter mais informações sobre a disposição dos tubos.)

Tabela 17. Valores aceitáveis de reações de mutações do EGFR de amostras no canal Green (FAM) (Ensaio de detecção de mutações do EGFR)

Ensaio	Intervalo de C_T	Intervalo de cut-off de ΔC_T
T790M	0,00–40,00	$-10,00 \geq a \leq 7,40$
Deleções	0,00–40,00	$-10,00 \geq a \leq 8,00$
L858R	0,00–40,00	$-10,00 \geq a \leq 8,90$
L861Q	0,00–40,00	$-10,00 \geq a \leq 8,90$
G719X	0,00–40,00	$-10,00 \geq a \leq 8,90$
S768I	0,00–40,00	$-10,00 \geq a \leq 8,90$
Inserções	0,00–40,00	$-10,00 \geq a \leq 8,00$

- Se o C_T do canal Green (FAM) da amostra ficar dentro do intervalo especificado, será observada uma amplificação FAM positiva.
- Se o C_T do canal Green (FAM) da amostra ficar acima do intervalo especificado, ou se não ocorrer amplificação, será observada uma amplificação FAM negativa.

Conforme indicado abaixo, calcule o valor de ΔC_T de cada tubo de detecção de mutações do EGFR que apresente amplificação FAM positiva, certificando-se de que os valores de C_T de mutação e de controle sejam da mesma amostra. (Consulte a Tabela 7 para obter mais informações sobre a disposição dos tubos.)

$$\Delta C_T = [\text{valor de } C_T \text{ do ensaio de mutação}] - [\text{valor de } C_T \text{ do ensaio de controle}]$$

Compare o valor de ΔC_T da amostra com o intervalo de cut-off de ΔC_T do ensaio em questão (Tabela 17). Certifique-se de que o intervalo de cut-off de ΔC_T correto seja aplicado.

O ponto superior do intervalo de cut-off de ΔC_T é o ponto acima do qual poderá potencialmente existir um sinal positivo de um ensaio devido ao sinal de fundo do primer ARMS no DNA de tipo selvagem. Se o valor de ΔC_T da amostra for superior ao intervalo de cut-off de ΔC_T de um ensaio, a amostra é classificada como negativa ou além dos limites de detecção do kit para esse ensaio. Se o valor da amostra estiver abaixo do limite inferior do intervalo de cut-off de ΔC_T , então isso poderá ser potencialmente devido a artefatos de fluorescência.

O estado de cada reação de mutação de cada amostra poderá ser um dos seguintes:

- Mutação detectada
- Mutação não detectada
- Inválida

Mutação detectada

A amplificação do canal Green (FAM) é positiva e o valor de ΔC_T está dentro do intervalo de cut-off de ΔC_T . Se várias mutações forem detectadas em uma amostra, todas elas poderão ser relatadas.

Mutação não detectada

A amplificação do canal Green (FAM) é positiva e o valor de ΔC_T é superior ao intervalo de cut-off de ΔC_T .

A amplificação do canal Green (FAM) é negativa e a amplificação do canal Yellow (HEX) (controle interno) é positiva.

Inválida

A amplificação do canal Yellow (HEX) (controle interno) é inválida.

A amplificação do canal Green (FAM) é negativa e a amplificação do canal Yellow (HEX) (controle interno) é negativa.

Nota: Uma amostra de um tubo poderá ser negativa na amplificação do canal Yellow (HEX), mas poderá ser positiva na amplificação do canal Green (FAM) de um segundo tubo. Nesse caso, um resultado de "mutation detected" (mutação detectada) no segundo tubo pode ser considerado válido, mas a mutação específica identificada poderá não ser a única mutação possível nessa amostra.

○ ΔC_T calculado está abaixo do intervalo de cut-off de ΔC_T e a amplificação do canal Yellow (HEX) (controle interno) está dentro do intervalo esperado.

Anexo B: Instalação do *therascreen* EGFR CE Assay Package

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit foi concebido para ser usado com o instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM e um rotor de 72 poços. O *therascreen* EGFR CE Assay Package está disponível para download na página do produto do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit versão 2 em www.qiagen.com. Navegue para Product Resources (Recursos do produto) > Supplementary Protocols (Protocolos suplementares) para baixar o pacote de ensaios. O pacote de ensaios inclui o "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" e o "*therascreen* EGFR CE Locked Template".

Nota: O *therascreen* EGFR CE Assay Package só é compatível com o software Rotor-Gene Q, versão 2.3.5 ou posterior. Antes de proceder à instalação do *therascreen* EGFR CE Assay Package, certifique-se de que a versão correta do software Rotor-Gene Q esteja instalada. Se o seu instrumento Rotor-Gene Q MDx foi fornecido com uma versão de software anterior, atualize o software fazendo o download do software Rotor-Gene Q, versão 2.3.5 ou posterior, disponível na página do produto do Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (na seção "Product Resources" [Recursos do produto] em "Operating Software" [Software de operação]); acesse www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources.

Procedimento

1. Baixe o *therascreen* EGFR CE Assay Package em www.qiagen.com e transfira-o para um dispositivo de armazenamento USB sem vírus.

Nota: O pacote de ensaios está disponível na página do produto do *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit versão 2. Acesse Product Resources (Recursos do produto) > Supplementary Protocols (Protocolos suplementares) para baixar o pacote de ensaios.

2. Insira o dispositivo de armazenamento USB no computador conectado ao instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

3. Localize o arquivo do *therascreen* EGFR CE Assay Package.
4. Clique com o botão direito no *therascreen* EGFR CE Assay Package e, em seguida, selecione Extract all (Extrair tudo) para descompactar o arquivo.
5. Clique duas vezes em *therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.6.exe* para iniciar a instalação.

Alternativamente, localize e inicie esse arquivo executável usando o navegador de arquivos do computador conectado.

O assistente de instalação do *therascreen* EGFR CE Assay Package abre.

6. Clique em Next (Próximo) para continuar (Figura 41).

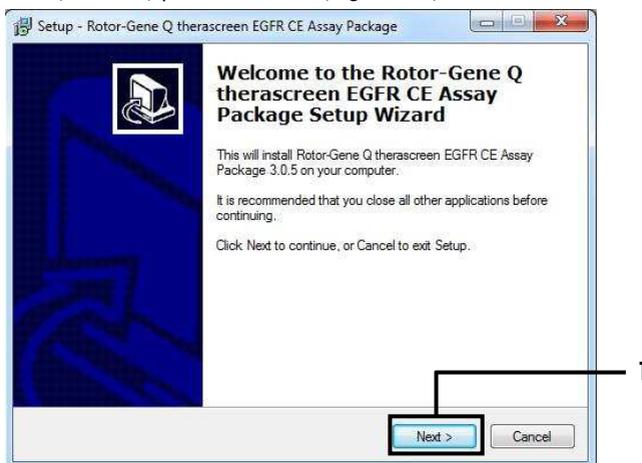


Figura 41. A caixa de diálogo "Setup Wizard" (Assistente de instalação) (1 = "Next") (Avançar).

7. Leia o Acordo de licença na caixa de diálogo e selecione I accept the agreement (Aceito o acordo). Clique em Next (Próximo) para continuar (Figura 42).

A instalação é iniciada automaticamente.

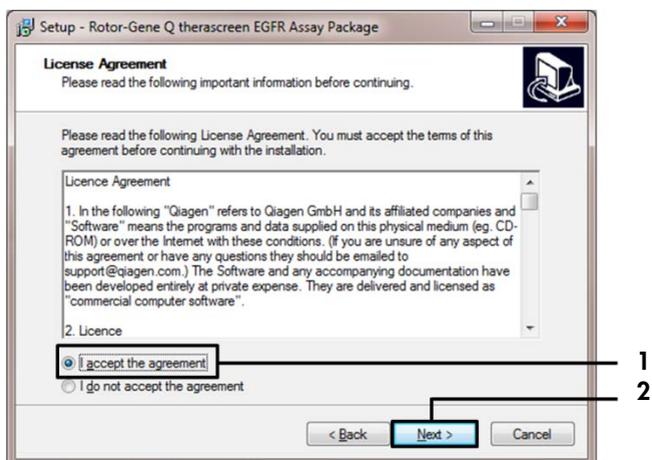


Figura 42. A caixa de diálogo "License Agreement" (Acordo de licença). 1 = "I accept the agreement" (Aceito o acordo); 2 = "Next" (Próximo).

8. Após a conclusão da instalação, clique em Finish (Concluir) na última caixa de diálogo do Setup Wizard (Assistente de configuração) (Figura 43).

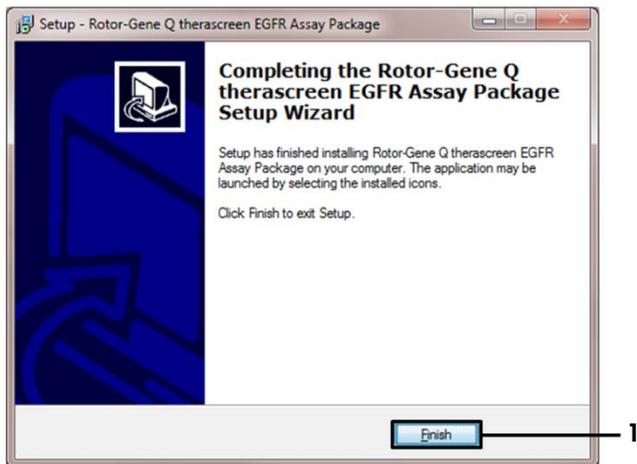


Figura 43. Concluindo o assistente de instalação (1 = "Finish") (Concluir).

9. Reinicie o computador.

Os atalhos para o "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" (Modelo bloqueado da execução de controle do *therascreen* EGFR CE) e para o "*therascreen* EGFR CE Locked Template" (Modelo bloqueado do *therascreen* EGFR CE) são gerados automaticamente e exibidos na área de trabalho (Figura 44).

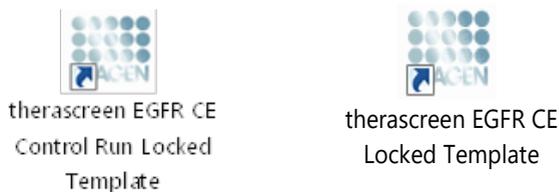


Figura 44. Ícones EGFR CE Control Run Locked Template (Modelo bloqueado da execução de controle do EGFR CE) e EGFR CE Locked Template (Modelo bloqueado do EGFR CE)

Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico no site www.qiagen.com/Support, ligue 00800-22-44-6000 ou entre em contato com um dos Departamentos de Assistência Técnica da QIAGEN ou os distribuidores locais (consulte o verso do manual ou acesse www.qiagen.com).

Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Ref.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reações: ensaio de controle, 7 ensaios de mutação, Controle positivo, Taq DNA Polimerase, Água para NTC e Água para diluição de amostras	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package	Pacote de protocolo do software para uso com o <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit e o instrumento QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Baixar
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparos de DNA: colunas QIAamp MinElute®, Proteinase K, tampões e Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparos: 50 colunas QIAamp MinElute, Proteinase K, tampões e Collection Tubes (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM e acessórios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador de real-time PCR e analisador de analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador laptop, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão de obra; instalação e treinamento	9002033

Produto	Conteúdo	Ref.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de real-time PCR e analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão de obra; instalação e treinamento não incluídos	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Bloco de alumínio para o preparo manual da reação com uma pipeta monocal em 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reações	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10.000 reações	981106

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit QIAGEN correspondente. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Data	Alterações
R5, janeiro de 2019	Adição de Representante autorizado (capa). Atualização da seção "Símbolos".
R6, outubro de 2019	Alteração de Fabricante legal (página de rosto) Adaptação do nome do instrumento, de Rotor-Gene Q MDx para Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, para estar alinhado com o nome no rótulo do instrumento Adição de condições de armazenamento do reagente na seção Armazenamento e manuseio de reagentes Atualização da Tabela 1 para adicionar uma nota com relação à remoção da mutação COSM6254 do banco de dados COSMIC Atualização da seção Limitações com informações relativas ao ensaio de deleções do éxon 19 e ao ensaio L858R Remoção do símbolo EC + REP da página de rosto e da seção Símbolos
R7, junho de 2020	Atualização do número de versão do EGFR Assay Package de 3.0.5 para 3.0.6 Atualização das referências ao software RGQ da versão 2.3 para 2.3.5 ou posterior Atualização da Tabela 9 e 17 para implementar os novos intervalos de cut-off e ajustar todas as descrições relevantes em conformidade (em todo o manual) Atualização a todos os capítulos do protocolo para incluir informações sobre a importância da mistura nas seções Pontos importantes antes de começar; destaque aos detalhes de mistura em todas as etapas de mistura; adição de etapas de mistura sempre que necessário Adição do sinalizador MUTATION_EARLY_CT na Tabela 8 Todas as referências ao CD foram removidas e atualizadas com informações de download

Acordo de licença limitada para o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

O uso deste produto implica a concordância por parte de qualquer comprador ou usuário do produto com os seguintes termos:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo ao uso exclusivo de componentes contidos no painel. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incorporar os componentes deste painel com quaisquer componentes não incluídos nele, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infrinjam os direitos de terceiros.
2. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou o seu uso não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este painel e seus componentes estão licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN renuncia especificamente a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, à exceção das expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do painel concordam em não realizar nem permitir que outra pessoa realize qualquer etapa que possa levar a ou facilitar qualquer um dos atos proibidos acima. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos seus custos de investigação e de Tribunal, incluindo honorários de advogados, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Acordo de licença limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); GIOTRIF® (Boehringer Ingelheim), IRESSA® (AstraZeneca Group). Os nomes registrados, marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

O *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit é um kit de diagnóstico com marcação CE, em conformidade com a Diretiva da União Europeia para diagnósticos in vitro 98/79/CE. Não está disponível em todos os países.

1121935 06-2020 HB-1909-007 © 2020 QIAGEN, todos os direitos reservados.

