

# Manual do therascreen<sup>®</sup> EGFR Pyro<sup>®</sup> Kit



Versão 1



Para uso em diagnóstico in vitro



**REF** 971480

**HB** 1061827PTBR

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

**R3** **MAT** 1061827PTBR



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

A QIAGEN é a principal fornecedora de tecnologias inovadoras de amostra e ensaio, permitindo o isolamento e a detecção de conteúdos de qualquer amostra biológica. Nossos avançados serviços e produtos de alta qualidade garantem o sucesso, desde a amostra até o resultado.

### **A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:**

- Purificação de DNA, RNA e proteínas
- Ensaio de ácidos nucleicos e proteínas
- Pesquisa em microRNA e RNAi
- Automação de tecnologias de amostra e ensaio

A nossa missão é possibilitar que você alcance sucesso notável e progressos. Para obter mais informações, acesse [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Conteúdo

<b>Uso previsto</b>	<b>5</b>
<b>Resumo e explicação</b>	<b>5</b>
<b>Princípio do procedimento</b>	<b>6</b>
Conteúdos do kit	8
<b>Materiais necessários, mas não fornecidos</b>	<b>10</b>
<b>Avisos e precauções</b>	<b>11</b>
Informações de segurança	11
Precauções gerais	12
<b>Armazenamento e manuseio de reagentes</b>	<b>13</b>
<b>Armazenamento e manuseio de amostras</b>	<b>14</b>
<b>Procedimento</b>	<b>15</b>
Isolamento de DNA	15
Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24	16
Protocolo 2: PCR usando os reagentes de PCR fornecidos com o <i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit	18
Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em gotas de Streptavidin Sepharose High Performance	21
Protocolo 4: Preparo de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24	23
Protocolo 5: Executando o PyroMark Q24	27
Protocolo 6: Execução Analysis of a PyroMark Q24	29
<b>Interpretação dos resultados</b>	<b>33</b>
Interpretação dos resultados de análise e detecção de mutações de nível baixo	33
Guia de resolução de falhas	38
<b>Controle de qualidade</b>	<b>42</b>
<b>Limitações</b>	<b>42</b>
<b>Características de desempenho</b>	<b>43</b>
Limite de branco e limite de detecção	43
Linearidade	46
Precisão	47
Avaliação de diagnóstico	48

<b>Referências</b>	<b>52</b>
<b>Símbolos</b>	<b>53</b>
<b>Informações de contato</b>	<b>53</b>
<b>Anexo A: Configuração dos ensaios <i>therascreen</i> EGFR Pyro</b>	<b>54</b>
<b>Anexo B: Esvaziando o contêiner de resíduos e os canais</b>	<b>59</b>
<b>Informações para pedidos</b>	<b>60</b>

## Uso previsto

O *therascreen* EGFR Pyro Kit é um teste de detecção baseado em sequência de ácidos nucleicos *in vitro*, com base na tecnologia Pyrosequencing<sup>®</sup>, para a detecção quantitativa de mutações nos éxons 18, 19, 20 e 21 do gene EGFR humano em DNA genômico derivado de amostras de tecido humano.

O *therascreen* EGFR Pyro Kit foi projetado para fornecer informações aos médicos para ajudar na seleção de pacientes com câncer que tenham maior probabilidade de se beneficiar de tratamentos com terapias anti-EGFR. Para uso em diagnóstico *in vitro*.

Apenas para uso no sistema PyroMark<sup>®</sup> Q24. Os sistemas PyroMark Q24 incluem o seguinte:

- Os instrumentos PyroMark Q24 e PyroMark Q24 MDx.
- A PyroMark Q24 Vacuum Workstation e a PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation.
- O PyroMark Q24 Software (versão 2.0) e o PyroMark Q24 MDx Software (versão 2.0).

O produto foi projetado para ser utilizado por usuários profissionais, tais como técnicos e médicos, com formação em procedimentos de diagnóstico *in vitro*, em técnicas de biologia molecular e no sistema PyroMark Q24.

## Resumo e explicação

O *therascreen* EGFR Pyro Kit permite a medição quantitativa de mutações em códons 719, 768, 790 e 858–861, bem como deleções e mutações complexas em éxon 19 do gene EGFR humano.

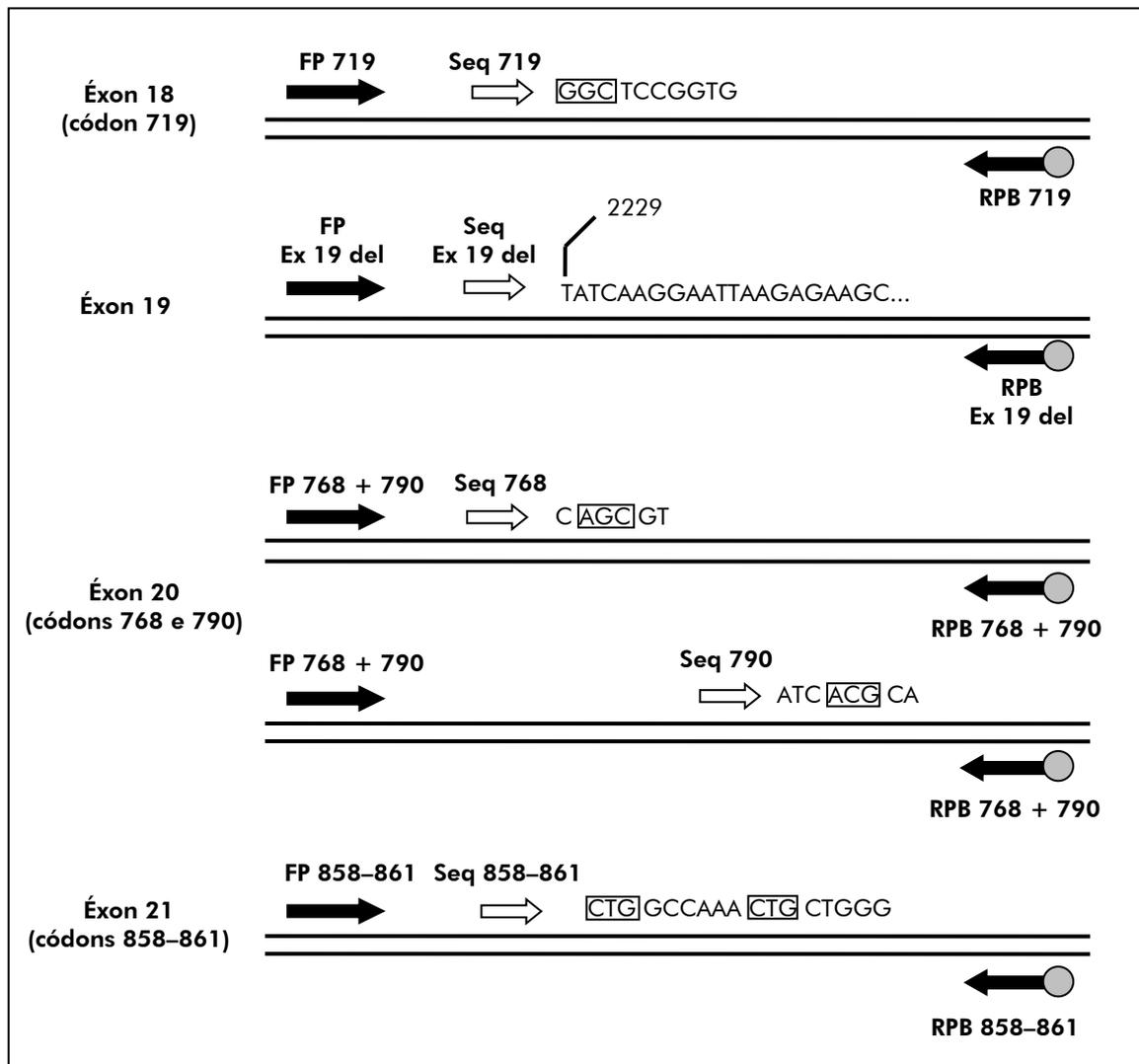
O kit consiste em quatro ensaios de PCR (Figura 1) para a detecção de:

- Mutações no códon 719 (éxon 18)
- Mutações nos códons 768 e 790 (éxon 20)
- Mutações nos códons 858 a 861 (éxon 21)
- Deleções e mutações complexas em éxon 19

As quatro regiões são amplificadas separadamente por PCR e sequenciadas pela região definida. O amplicon que cobre os códons 768 e 790 está dividido em duas reações de sequenciamento. As sequências ao redor das posições definidas atuam como picos de normalização e de referência para a quantificação e a avaliação de qualidade da análise.

Todos os ensaios são orientados para a frente.

O produto consiste em uma mistura de primer de PCR e primers de sequenciamento para cada ensaio. Os primers são fornecidos em solução. Cada frasco contém 24 µl de cada primer ou mistura de primer.



**Figura 1. Ilustração do ensaio EGFR.** A sequência indicada é a sequência analisada para uma amostra de tipo selvagem. **FP:** primers de PCR direto; **RPB:** primers de PCR inverso (B indica biotilação); **Seq:** primers de sequenciamento.

## Princípio do procedimento

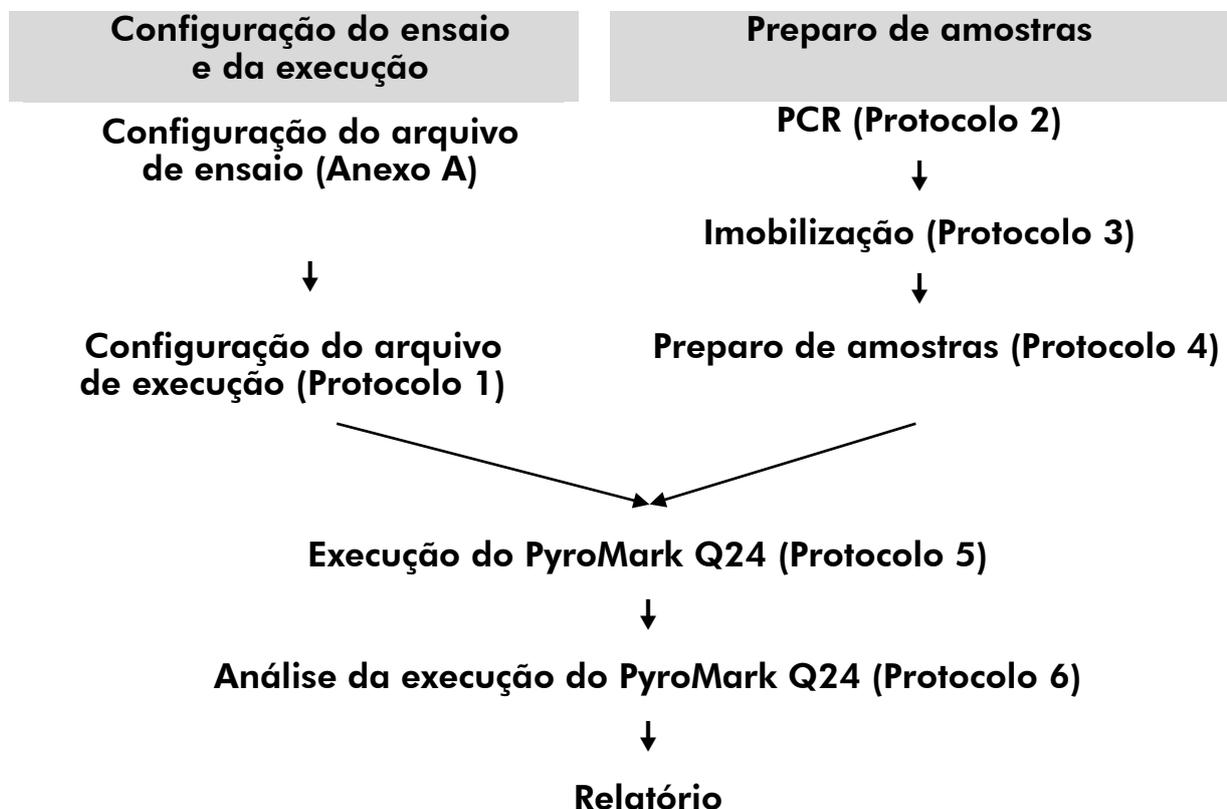
O seguinte fluxo de trabalho ilustra o procedimento de ensaio. Após a realização da PCR usando primers que têm como alvo os éxons 18, 19, 20 e 21, os amplicons são imobilizados em gotas de Streptavidin Sepharose® High Performance. O DNA de fita simples é preparado e os primers de sequenciamento correspondentes se hibridam com o DNA. Em seguida, as amostras são analisadas no sistema PyroMark Q24 usando um arquivo de configuração de execução e um arquivo de execução.

Recomenda-se o uso do EGFR Plug-in Report para analisar a execução. O EGFR Plug-in Report pode ser obtido por e-mail através de [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Contudo, a execução também pode ser analisada usando a ferramenta de análise integrada do sistema PyroMark Q24. A "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) pode então ser ajustada para detectar diferentes deleções no éxon 19 e de mutações raras nos outros éxons após a execução (consulte "Protocolo 6: Execução Analysis of a PyroMark Q24", na página 29).

**Nota:** O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado com a revisão R1 do *Manual do theascreen EGFR Pyro Kit* (consulte "Protocolo 4: Preparo de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24", na página 23).

### Fluxo de trabalho do procedimento theascreen EGFR Pyro



### Controles

O DNA de controle não metilado está incluído no kit como um controle positivo para PCR e reações de sequenciamento. Esse DNA de controle possui um genótipo de tipo selvagem nas regiões sequenciadas usando esse kit e é necessário para obter uma interpretação dos resultados adequada e para a identificação de mutações de nível baixo (consulte "Interpretação dos resultados", na página 33). Inclua uma amostra com DNA de controle não metilado para cada ensaio em todas as execuções de Pyrosequencing.

Além disso, um controle negativo (sem DNA modelo) deve ser incluído em cada configuração de PCR para, pelo menos, um ensaio.

# Materiais fornecidos

## Conteúdos do kit

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

therascreen <b>EGFR Pyro Kit</b>	<b>(24)</b>
<b>Ref.</b>	<b>971480</b>
<b>Número de reações</b>	<b>24</b>
Seq Primer EGFR 719 (Primer de sequenciamento EGFR 719)	24 µl
Seq Primer EGFR Ex 19 Del (Primer de sequenciamento EGFR Ex 19 Del)	24 µl
Seq Primer EGFR 768 (Primer de sequenciamento EGFR 768)	24 µl
Seq Primer EGFR 790 (Primer de sequenciamento EGFR 790)	24 µl
Seq Primer EGFR 858–861 (Primer de sequenciamento EGFR 858–861)	24 µl
PCR Primer EGFR 719 (Primer de sequenciamento EGFR 719)	24 µl
PCR Primer EGFR Ex19 Del (Primer de PCR EGFR Ex19 Del)	24 µl
PCR Primer EGFR 768+790 (Primer de PCR EGFR 768+790)	24 µl
PCR Primer EGFR 858–861 (Primer de PCR EGFR 858–861)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x	2 × 850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	5 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (DNA de controle não metilado, 10 ng/µl)	100 µl

## Tampões e reagentes therascreen (caixa 2/2)

<b>Tampões e reagentes</b> therascreen		
PyroMark Binding Buffer		2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer		2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution*		2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x		2 x 25 ml
Enzyme Mixture (Mistura enzimática)		2 frascos
Substrate Mixture (Mistura de substrato)		2 frascos
dATP $\alpha$ S		2 x 1180 $\mu$ l
dCTP		2 x 1180 $\mu$ l
dGTP		2 x 1180 $\mu$ l
dTTP		2 x 1180 $\mu$ l
Handbook (Manual)		1

\* Contém hidróxido de sódio.

## Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com produtos químicos, 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.

- Kit de isolamento de DNA (consulte "Isolamento de DNA", na página 15)
- Pipetas (ajustáveis)\*
- Ponteiros de pipetas estéreis (com filtros para configuração de PCR)
- Microcentrífuga de bancada\*
- Termociclador\* e tubos de PCR apropriados
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, ref. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (ref. 9001513 ou 9001514)\*†
- PyroMark Q24 Software (ref. 9019063 ou 9019062)†
- PyroMark Q24 Plate (ref. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (ref. 979302)†
- PyroMark Q24 Vacuum Workstation (ref. 9001515 ou 9001517)\*†
- Bloco de aquecimento\* capaz de atingir 80 °C
- Tiras ou placa de PCR de 24 poços
- Tampas de tiras
- Água de alta pureza (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou equivalente).  
**Nota:** Uma quantidade suficiente de água é fornecida com o kit para PCR, imobilização de DNA e para dissolver a mistura enzimática e a mistura de substrato. Para diluir o PyroMark Wash Buffer, 10x, é necessária uma quantidade adicional de água de alta pureza.
- Etanol (70%)‡

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

† Com marcação CE-IVD de acordo com a Diretiva 98/79/CE da UE. Todos os outros produtos listados não possuem marcação CE-IVD com base na Diretiva 98/79/CE da UE.

‡Não utilize álcool desnaturado, pois ele contém outras substâncias, como metanol ou metiletilcetona.

## Agitadores de placas recomendados

Os agitadores de placas apresentados na Tabela 1 são recomendados para uso com o *therascreen* EGFR Pyro Kit.

**Tabela 1. Agitadores de placas recomendados para uso com o *therascreen* EGFR Pyro Kit**

Fabricante	Produto	Referência
Eppendorf	Thermomixer comfort (Dispositivo básico)	5355 000,011
	Thermoblock for MTP	5363 000,012
	Adapter plate for 96 x 0.2ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007,009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

## Avisos e precauções

Para uso em diagnóstico in vitro

## Informações de segurança

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (SDSs) aplicáveis. Essas fichas estão disponíveis online em formato PDF conveniente e compacto em [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde você pode encontrar, visualizar e imprimir SDS para cada kit e componente de kit QIAGEN.

As seguintes declarações de risco e precaução se aplicam aos componentes do *therascreen EGFR Pyro Kit*.

### PyroMark Denaturation Solution



Aviso! Provoca irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Pode ser corrosivo para metais. Absorva derramamentos para evitar danos materiais. Conserve apenas no recipiente original. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### Mistura enzimática PyroMark



Contém: (R\*,R\*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol; ácido acético. Perigo! Provoca irritação da pele. Causa lesões graves nos olhos. EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Entre em contato com um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### Mistura de substrato PyroMark



Contém: ácido acético. Aviso! Provoca irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Se a irritação nos olhos persistir: Consulte um médico. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

## Precauções gerais

**Nota:** O usuário deve sempre prestar atenção no seguinte.

- Para melhores resultados, é necessário que as instruções do manual do usuário sejam rigorosamente observadas. Não é recomendável diluir os reagentes de forma diferente à descrita neste manual, já que pode ocorrer uma diminuição do desempenho.
- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado (consulte "Protocolo 4: Preparo de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24", na página 23) quando comparado com a revisão R1 do *Manual do therascreen EGFR Pyro Kit*.

- Os componentes desse produto são suficientes para realizar 24 reações em até 5 execuções independentes.
- Use ponteiras de pipetas estéreis com filtros (para configuração de PCR).
- Armazene e extraia materiais positivos (amostras, controles positivos e amplicons) separadamente de todos os outros reagentes e adicione-os à mistura da reação em uma instalação separada.
- Descongele todos os componentes por completo à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar o ensaio.
- Após o descongelamento, misture os componentes (pipetando repetidamente para cima e para baixo ou agitando em vórtex) e centrifugue brevemente.
- Os resultados com falhas não são usados como base para avaliação do status mutacional.

## Armazenamento e manuseio de reagentes

O *therascreen* EGFR Pyro Kit é enviado em duas caixas. O *therascreen* EGFR Pyro Kit (caixa 1/2) é enviado em gelo seco. A PyroMark PCR Master Mix, o CoralLoad Concentrate, o DNA de controle não metilado e todos os primers devem ser armazenados entre -30 e -15 °C assim que forem recebidos.

Os reagentes e tampões *therascreen* (caixa 2/2) contendo tampões, mistura enzimática, mistura de substrato, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP e dTTP (os reagentes para análise Pyrosequencing<sup>®</sup>) são enviados em embalagens resfriadas. Esses componentes devem ser armazenados entre 2 e 8 °C assim que forem recebidos. Para minimizar a perda de atividade, é aconselhável manter tanto a mistura enzimática quanto a mistura de substrato nos frascos fornecidos.

As misturas de substrato e enzimática reconstituídas são estáveis por, pelo menos, dez dias quando armazenadas entre 2 e 8 °C. Elas podem ser congeladas e armazenadas nos respectivos frascos entre -30 e -15 °C. Os reagentes congelados não devem ser sujeitos a mais de três ciclos de congelamento/descongelamento.

**Nota:** Nucleotídeos não devem ser congelados.

O *therascreen* EGFR Pyro Kit permanece estável até a data de validade, quando armazenado nas condições especificadas.

## **Armazenamento e manuseio de amostras**

Todas as amostras devem ser tratadas como materiais potencialmente infecciosos.

O material das amostras é DNA genômico humano, extraído de amostras de sangue ou fixadas em formalina e conservadas em parafina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE).

Amostras de humanos submetidos a tratamento com heparina não devem ser utilizadas. Amostras de sangue que tenham sido coletadas em tubos contendo heparina como anticoagulante não devem ser utilizadas. A heparina afeta a PCR.

## Procedimento

### Isolamento de DNA

O desempenho do sistema foi estabelecido usando o EZ1<sup>®</sup> DNA Tissue Kit e o QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit para a extração de DNA humano a partir de amostras de tumores fixadas em formalina e conservadas em parafina. O desempenho do sistema QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit foi estabelecido usando amostras de sangue de doadores saudáveis parcialmente fortificadas com células tumorais.

Os kits QIAGEN<sup>®</sup> mostrados na Tabela 2 são recomendados para a purificação de DNA a partir dos tipos de amostra humana indicados para uso com o *therascreen* EGFR Pyro Kit. Realize a purificação de DNA de acordo com as instruções nos manuais do kit.

**Tabela 2. Kits de purificação de DNA recomendados para uso com o *therascreen* EGFR Pyro Kit**

<b>Material de amostra</b>	<b>Kit de isolamento de ácido nucleico</b>	<b>Referência (QIAGEN)</b>
Tecido conservado em parafina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sangue	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

\* Siga o protocolo para utilização com tecido conservado em parafina. O EZ1 DNA Tissue Kit deve ser usado em conjunto com o EZ1 Advanced (ref. 9001410 ou 9001411) e com o EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (ref. 9018298), com o EZ1 Advanced XL (ref. 9001492) e o EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (ref. 9018700) ou com o BioRobot<sup>®</sup> EZ1 (ref. 9000705; não está mais disponível) e o EZ1 DNA Paraffin Section Card (ref. 9015862).

† Com marcação CE-IVD de acordo com a Diretiva 98/79/CE da UE.

# Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24

## Ponto importante antes de começar

- Se necessário, o LOB pode ser confirmado usando uma amostra de tipo selvagem para gerar uma placa de resultados completa. Para obter detalhes, consulte a Diretriz EP17-A do CLSI "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protocolo para a determinação de limites de detecção e limites de quantificação; diretriz aprovada).

## O que fazer antes de começar

- Se o EGFR Plug-in Report não tiver sido instalado, crie uma Assay Setup (Configuração do ensaio) (consulte o Anexo A, na página 54). Isso deve ser realizado apenas uma vez, antes de executar os ensaios *therascreen* EGFR Pyro pela primeira vez. Caso o EGFR Plug-in Report tenha sido instalado, estão disponíveis Assay Setups (Configurações de ensaio) predefinidas no atalho do navegador do PyroMark Q24 software, no caminho "Example Files/PyroMark Setups/EGFR". O EGFR Plug-in Report pode ser obtido por e-mail através de [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

## Procedimento

1. **Clique em  na barra de ferramentas.**  
Um novo arquivo de execução é criado.
2. **Insira os parâmetros de execução (consulte "Parâmetros de execução", na página 17).**
3. **Configure a placa adicionando ensaios para as 5 reações de sequenciamento diferentes aos poços correspondentes às amostras para análise.**  
**Nota:** Uma amostra de controle negativo (sem DNA modelo) deve ser incluída em cada configuração de PCR para, pelo menos, um ensaio.  
**Nota:** Inclua uma amostra com DNA de controle não metilado para cada ensaio em todas as execuções Pyrosequencing (consulte "Controles", na página 11).
4. **Quando a execução estiver configurada e pronta para ser executada no sistema PyroMark Q24, imprima uma lista de volumes necessários de mistura enzimática, mistura de substrato e nucleotídeos e a configuração da placa. Selecione "Pre Run Information" (Informações de pré-execução) no menu "Tools" (Ferramentas) e, quando o relatório aparecer, clique em .**
5. **Feche o arquivo de execução e copie-o para um pen drive (fornecido com o sistema) usando o Windows® Explorer.**

**Nota:** As Informações de pré-execução impressas podem ser usadas como um modelo para a configuração de amostras (consulte "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em gotas de Streptavidin Sepharose High Performance", na página 21).

Para executar a placa no PyroMark Q24, consulte "Protocolo 5: Executando o PyroMark Q24", na página 27.

## Parâmetros de execução

Run name (Nome da execução):	O nome da execução é dado quando o arquivo é salvo. Renomear o arquivo também altera o nome da execução.
Instrument method (Método de instrumento):	Selecione o método de instrumento de acordo com o cartucho que será usado para a execução. Consulte as instruções fornecidas com os produtos.
Plate ID (ID da placa):	<b>Opcional:</b> Insira o ID da PyroMark Q24 Plate.
Bar code (Código de barras):	<b>Opcional:</b> Insira um número de código de barras para a placa ou, se você tiver um leitor de código de barras conectado ao computador, posicione o cursor do mouse na caixa de texto "Barcode" (Código de barras) (clique na caixa) e digitalize o código de barras.
Kit and Reagent ID (ID do kit e do reagente):	<b>Opcional:</b> Insira o número de lote do <i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit a ser usado. O número de lote pode ser encontrado no rótulo do produto. <b>Nota:</b> Recomendamos inserir o ID do kit e o ID do reagente para que qualquer problema inesperado com os reagentes possa ser rastreado.
Run note (Nota de execução):	<b>Opcional:</b> Insira uma nota sobre os conteúdos ou o propósito da execução.

## Adicionar arquivos de ensaio

Para adicionar um ensaio a um poço, você pode:

- Clicar com o botão direito do mouse no poço e selecionar "Load Assay" (Carregar ensaio) no menu de contexto.
- Selecionar o ensaio no atalho do navegador e clicar e arrastar o ensaio para o poço.

Um poço é codificado por cor de acordo com o ensaio carregado no poço.

## Inserir IDs de amostra e notas

Para inserir um ID de amostra ou uma nota, selecione a célula e insira o texto.

Para editar um ID de amostra ou uma nota, selecione a célula (o conteúdo atual será selecionado) ou clique duas vezes na célula.

## Protocolo 2: PCR usando os reagentes de PCR fornecidos com o *therascreen* EGFR Pyro Kit

Esse protocolo destina-se a 4 amplificações de PCR separadas de uma região que contém o códon 719 (éxon 18), códons 768 e 790 (éxon 20), códons 858–861 (éxon 21) ou deleções e mutações complexas no éxon 19 usando os primers do *therascreen* EGFR Pyro.

### Pontos importantes antes de começar

- A polimerase de DNA HotStarTaq® na PyroMark Master Mix exige uma etapa de ativação de **15 minutos a 95 °C**.
- Configure todas as misturas da reação em uma área separada daquela usada para a purificação de DNA, adicionando o DNA modelo à PCR, à análise de produto de PCR ou ao preparo de amostras antes da análise Pyrosequencing.
- Use ponteiras descartáveis contendo filtros hidrofóbicos para minimizar contaminação cruzada.

### O que fazer antes de começar

- Antes de abrir os tubos com primers de PCR, centrifugue brevemente para coletar o conteúdo no fundo dos tubos.
- Ajuste a concentração do controle e da amostra de DNA para 0,4 a 2 ng/μl, se necessário.

### Procedimento

- 1. Congele todos os componentes necessários (consulte a Tabela 3).**  
Misture bem antes de usar.
- 2. Prepare uma mistura de reação para cada primer de PCR definido de acordo com a Tabela 3.**

Normalmente, a mistura da reação contém todos os componentes necessários para a PCR exceto a amostra.

Prepare um volume de mistura de reação superior ao necessário para o número total de ensaios de PCR a serem realizados.

**Tabela 3. Preparo da mistura de reação para cada mistura de primer de PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volume/reação (µl)</b>
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concentrate, 10x	2,5
PCR Primer EGFR 719 <b>ou</b> PCR Primer EGFR Ex19 Del <b>ou</b> PCR Primer EGFR 768 e 790 <b>ou</b> PCR Primer EGFR 858–861	1,0
Água (H <sub>2</sub> O, fornecida)	4,0
<b>Volume total</b>	<b>20,0</b>

**3. Misture completamente a mistura de reação e dispense 20 µl em cada tubo de PCR.**

Não é necessário manter os tubos de PCR no gelo, pois a HotStarTaq DNA Polymerase é inativa à temperatura ambiente.

**4. Adicione 5 µl de DNA modelo (2 a 10 ng de DNA genômico) aos tubos de PCR individuais (consulte a Tabela 4) e misture bem.**

**Nota:** Uma amostra de controle negativo (sem DNA modelo) deve ser incluída em cada configuração de PCR para, pelo menos, um ensaio.

**Nota:** Inclua uma amostra com DNA de controle não metilado para cada ensaio em todas as execuções Pyrosequencing (consulte "Controles", na página 7).

**Tabela 4. Preparo de PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volume/reação (µl)</b>
Mistura de reação	20
Amostra de DNA	5
<b>Volume total</b>	<b>25</b>

**5. Programe o termociclador de acordo com as instruções do fabricante usando as condições descritas na Tabela 5.**

**Tabela 5. Protocolo de ciclagem otimizado**

			<b>Comentários</b>
<b>Etapa de ativação inicial:</b>	15 minutos	95 °C	A HotStarTaq DNA polymerase é ativada por essa etapa de aquecimento.
<b>Ciclagem de 3 etapas:</b>			
Desnaturação	20 segundos	95 °C	
Hibridação	30 segundos	53°C	
Extensão	20 segundos	72°C	
Número de ciclos	42		
<b>Extensão final:</b>	5 minutos	72°C	

- 6. Posicione os tubos de PCR no termociclador e inicie o programa de ciclagem.**
- 7. Após a amplificação, prossiga com o "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em gotas de Streptavidin Sepharose High Performance", na página 21.**

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

Esse protocolo é usado para a imobilização de DNA modelo em Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) antes da análise no sistema PyroMark Q24.

### O que fazer antes de começar

- Permita que todos os reagentes e soluções necessários atinjam a temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de começar.

### Procedimento

1. **Agite gentilmente o frasco que contém Streptavidin Sepharose High Performance até obter uma solução homogênea.**
2. **Prepare uma mistura principal para imobilização de DNA de acordo com a Tabela 6. Prepare um volume 10% superior ao necessário para o número total de reações a serem realizadas.**

**Tabela 6. Mistura principal para imobilização de DNA**

<b>Componente</b>	<b>Volume/amostra (µl)</b>
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Água (H <sub>2</sub> O, fornecida)	28
<b>Volume total</b>	<b>70</b>

3. **Adicione 70 µl de mistura principal às tiras ou aos poços de uma placa de PCR de 24 poços, conforme predefinido na configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 16).**
4. **Adicione 10 µl de produto de PCR biotilado do Protocolo 2 a cada poço contendo a mistura principal, conforme predefinido na configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 16).**

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

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

**Nota:** Certifique-se de que não exista a possibilidade de vazamento entre os poços.

**6. Agite a placa de PCR em temperatura ambiente (15–25°C) por 5–10 minutos a 1400 rpm.**

**Nota:** Durante esta etapa, prepare a PyroMark Q24 Vacuum Workstation para o preparo de amostras conforme descrito no *Manual do usuário do PyroMark (PyroMark Q24 User Manual)*.

**7. Proceda imediatamente com o "Protocolo 4: Preparo de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24 ", na página 23.**

**Nota:** As gotas de Sepharose se sedimentam rapidamente. As gotas devem ser capturadas imediatamente após a agitação.

Se mais de um minuto tiver passado desde que a placa (ou as tiras) foi agitada, agite-a novamente por um minuto antes de capturar as gotas.

## Protocolo 4: Preparo de amostras antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24

Esse protocolo é usado para o preparo de DNA de fita simples e para a hibridação do primer de sequenciamento no modelo antes da análise Pyrosequencing no PyroMark Q24.

### Pontos importantes antes de começar

- Antes de abrir os tubos com primers de sequenciamento, centrifugue brevemente para coletar o conteúdo no fundo dos tubos.
- Adicione os cinco primers de sequenciamento diferentes no mesmo padrão, conforme predefinido para a placa na configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 16), dependendo da região de análise (códon 719 [éxon 18], códons 768 e 790 [éxon 20], códons 858–861 [éxon 21] ou éxon 19).
- O fluxo de trabalho foi ligeiramente modificado quando comparado com a revisão R1 do *Manual do thetascreen EGFR Pyro Kit* (etapa 18). Não encurte o tempo de resfriamento das amostras depois de aquecer a 80 °C.
- Execute regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro conforme descrito no *Manual do usuário do PyroMark Q24* e troque as sondas de filtro quando indicado.

### O que fazer antes de começar

- Posicione um PyroMark Q24 Plate Holder em um bloco de aquecimento pré-aquecido a 80 °C para usar na etapa 17. Deixe um segundo PyroMark Q24 Plate Holder à temperatura ambiente (15 a 25 °C) para usar na etapa 18.
- O PyroMark Wash Buffer é fornecido como um concentrado de 10x. Antes de usá-lo pela primeira vez, dilua em uma solução de trabalho de 1x, adicionando 225 ml de água de alta pureza a 25 ml de PyroMark Wash Buffer, 10x (volume final de 250 ml).

**Nota:** A solução de trabalho PyroMark Wash Buffer 1x é estável entre 2 e 8 °C até a data de validade marcada.

## Procedimento

1. **Dilua uma quantidade suficiente de cada primer de sequenciamento (Seq Primer EGFR 719, Seq Primer EGFR 768, Seq Primer EGFR 790, Primer de sequenciamento EGFR 858–861 e Primer de sequenciamento EGFR Ex 19 Del) no PyroMark Annealing Buffer, conforme mostrado na Tabela 7.**

Prepare um volume de primer de sequenciamento diluído superior ao necessário para o número total de amostras a serem sequenciadas (o número de amostras mais uma extra).

**Tabela 7. Exemplo de diluição dos primers de sequenciamento**

<b>Componente</b>	<b>Volume/amostra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Volume para 9 + 1 reações (<math>\mu</math>l)</b>
Seq Primer EGFR 719 <b>ou</b> Seq Primer EGFR Ex 19 Del <b>ou</b> Seq Primer EGFR 768 <b>ou</b> Seq Primer EGFR 790 <b>ou</b> Seq Primer EGFR 858–861	0,8	8
PyroMark Annealing Buffer	24,2	242
<b>Volume total</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

2. **Adicione 25  $\mu$ l de primer de sequenciamento diluído a cada poço da PyroMark Q24 Plate de acordo com a configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 16).**

**Nota:** Mantenha um dos PyroMark Q24 Plate Holders (fornecidos com a PyroMark Q24 Vacuum Workstation) à temperatura ambiente (15 a 25 °C) e use-o como suporte quando estiver preparando e movimentando a placa.

3. **Posicione a placa (ou as tiras) de PCR do Protocolo 3 e a PyroMark Q24 Plate na mesa de trabalho (Figura 2).**

**Nota:** Certifique-se de que a placa esteja na mesma orientação que quando as amostras foram carregadas.



**Figura 2.** Posicionamento da placa (ou das tiras) de PCR e da placa PyroMark Q24 na estação de trabalho de vácuo.

- 4. Aplique vácuo na ferramenta ligando o vácuo.**
- 5. Baixe cuidadosamente as sondas de filtro da ferramenta de vácuo para a placa (ou as tiras) de PCR para capturar as gotas contendo o modelo imobilizado. Mantenha as sondas no lugar por 15 segundos. Tome cuidado ao pegar na ferramenta de vácuo.**

**Nota:** As gotas de Sepharose se sedimentam rapidamente. As gotas devem ser capturadas imediatamente após a agitação.

Se mais de um minuto tiver passado desde que a placa (ou as tiras) foi agitada, agite-a novamente por um minuto antes de capturar as gotas.

- 6. Transfira a ferramenta de vácuo para o canal contendo 40 ml de etanol a 70% (Figura 2). Lave as sondas de filtro por 5 segundos.**
- 7. Transfira a ferramenta de vácuo para o canal contendo 40 ml de Denaturation Solution (Figura 2). Lave as sondas de filtro por 5 segundos.**
- 8. Transfira a ferramenta de vácuo para o canal contendo 50 ml de Wash Buffer (Figura 2). Lave as sondas de filtro por 10 segundos.**
- 9. Erga a ferramenta de vácuo para cima e para trás excedendo um ângulo de 90° na vertical por 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Figura 3).**



Figura 3. Ilustração da ferramenta de vácuo erguida excedendo um ângulo de 90° na vertical.

10. Enquanto a ferramenta de vácuo estiver posicionada acima da PyroMark Q24 Plate, desligue (Off) o interruptor de vácuo na ferramenta.
11. Libere as gotas na PyroMark Q24 Plate colocando as sondas de filtro no primer de sequenciamento diluído e movendo a ferramenta gentilmente de um lado para o outro.  
**Nota:** Tome cuidado para não danificar a superfície da PyroMark Q24 Plate arranhando-a com as sondas de filtro.
12. Transfira a ferramenta de vácuo para o canal contendo água de alta pureza (Figura 2) e agite-a por 10 segundos.
13. Lave as sondas de filtro colocando-as em água de alta pureza (Figura 2) e aplique vácuo. Lave as sondas com 70 ml de água de alta-pureza.
14. Erga a ferramenta de vácuo para cima e para trás excedendo um ângulo de 90° na vertical por 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Figura 3).
15. Desligue (Off) o interruptor de vácuo na ferramenta e coloque a ferramenta na posição Parada (P).
16. Desligue a bomba de vácuo.  
**Nota:** No final de um dia de trabalho, os resíduos líquidos e as soluções remanescentes devem ser descartados e a PyroMark Q24 Vacuum Workstation deve ser inspecionada quanto a poeira e derramamentos (consulte o Anexo B, na página 59).
17. Aqueça a PyroMark Q24 Plate com as amostras a 80 °C por 2 minutos usando o PyroMark Q24 Plate Holder pré-aquecido.
18. Remova a PyroMark Q24 Plate do suporte de placa aquecido e a posicione em um segundo PyroMark Q24 Plate Holder mantido à temperatura ambiente (15 a 25 °C) para permitir que as amostras esfriem até a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos.
19. prossiga com o "Protocolo 5: Executando o PyroMark Q24", na página 27.

## Protocolo 5: Executando o PyroMark Q24

Esse protocolo descreve o preparo e o carregamento de reagentes PyroMark Gold Q24 no PyroMark Q24 Cartridge. Ele também descreve como iniciar e finalizar uma execução no PyroMark Q24. Para obter uma descrição detalhada sobre como configurar uma execução, veja o *Manual do usuário do PyroMark Q24*.

### Ponto importante antes de começar

- O relatório Pre Run Information (Informações de pré-execução) encontrado no menu "Tools" (Ferramentas) na configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração de execução para o sistema PyroMark Q24", na página 16) fornece informações sobre o volume de nucleotídeos, tampão de substrato e tampão enzimático necessário para uma execução específica.

### O que fazer antes de começar

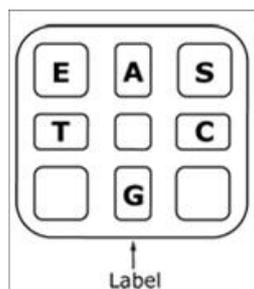
- Ligue o PyroMark Q24. O interruptor de alimentação está localizado na parte de trás do instrumento.

### Procedimento

- 1. Dissolva as misturas de substrato e enzimática liofilizadas em 620  $\mu$ l de água cada ( $H_2O$ , fornecida).**
- 2. Misture girando o frasco gentilmente.**  
**Nota:** Não use um agitador de vórtex!  
**Nota:** Para garantir que a mistura seja completamente dissolvida, deixe-a à temperatura ambiente (15 a 25 °C) por 5 a 10 minutos. Certifique-se de que a solução não esteja turva antes de encher o PyroMark Q24 Cartridge. Se os reagentes não forem usados imediatamente, coloque os frascos de reagente no gelo\* ou em um refrigerador.
- 3. Permita que os reagentes e o PyroMark Q24 Cartridge atinjam a temperatura ambiente (20 a 25 °C).**
- 4. Posicione o PyroMark Q24 Cartridge com o rótulo virado em sua direção.**
- 5. Carregue o PyroMark Q24 Cartridge com os volumes apropriados de nucleotídeos e misturas de substrato e enzimática de acordo com a Figura 4.**

Certifique-se de que nenhuma bolha de ar seja transferida da pipeta para o cartucho.

\* Ao trabalhar com produtos químicos, 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.



**Figura 4. Ilustração do PyroMark Q24 Cartridge visto de cima.** As anotações correspondem ao rótulo nos frascos de reagente. Adicione a mistura enzimática (**E**), a mistura de substrato (**S**) e os nucleotídeos (**A**, **T**, **C**, **G**) de acordo com as informações de volume fornecidas no relatório de Informações de pré-execução encontrado no menu "Tools" (Ferramentas) na configuração de execução.

6. **Abra a porta do cartucho e insira o cartucho de reagentes cheio com o rótulo virado para fora. Empurre o cartucho por completo e empurre-o para baixo.**
7. **Certifique-se de que a linha esteja visível na frente do cartucho e feche a porta.**
8. **Abra a estrutura do suporte de placa e posicione a placa no bloco de aquecimento.**
9. **Feche a estrutura do suporte de placa e a tampa do instrumento.**
10. **Insira o pen drive (contendo o arquivo de execução) na porta USB na frente do instrumento.**  
**Nota:** Não remova o pen drive até que a execução seja finalizada.
11. **Selecione "Run" (Executar) no menu principal (usando os botões da tela ▲ e ▼) e pressione "OK".**
12. **Selecione o arquivo de execução usando os botões da tela ▲ e ▼.**  
**Nota:** Para visualizar o conteúdo de uma pasta, selecione a pasta e pressione "Select" (Selecionar). Para voltar para a visualização anterior, pressione "Back" (Voltar).
13. **Quando o arquivo de execução for selecionado, pressione "Select" (Selecionar) para iniciar a execução.**
14. **Quando a execução estiver finalizada e o instrumento confirmar que o arquivo de execução foi salvo no pen drive, pressione "Close" (Fechar).**
15. **Remova o pen drive.**
16. **Abra a tampa do instrumento.**
17. **Abra a porta do cartucho e remova o cartucho de reagentes levantando-o e retirando-o.**
18. **Feche a porta.**
19. **Abra a estrutura do suporte de placa e remova a placa do bloco de aquecimento.**
20. **Feche a estrutura do suporte de placa e a tampa do instrumento.**
21. **Descarte a placa e limpe o cartucho, de acordo com as instruções na folha do produto fornecida com o cartucho.**
22. **Análise a execução de acordo com o "Protocolo 6: Execução Analysis of a PyroMark Q24", na página 29.**

## Protocolo 6: Execução Analysis of a PyroMark Q24

Esse protocolo descreve uma análise de mutação de uma execução de EGFR finalizada usando o PyroMark Q24 Software.

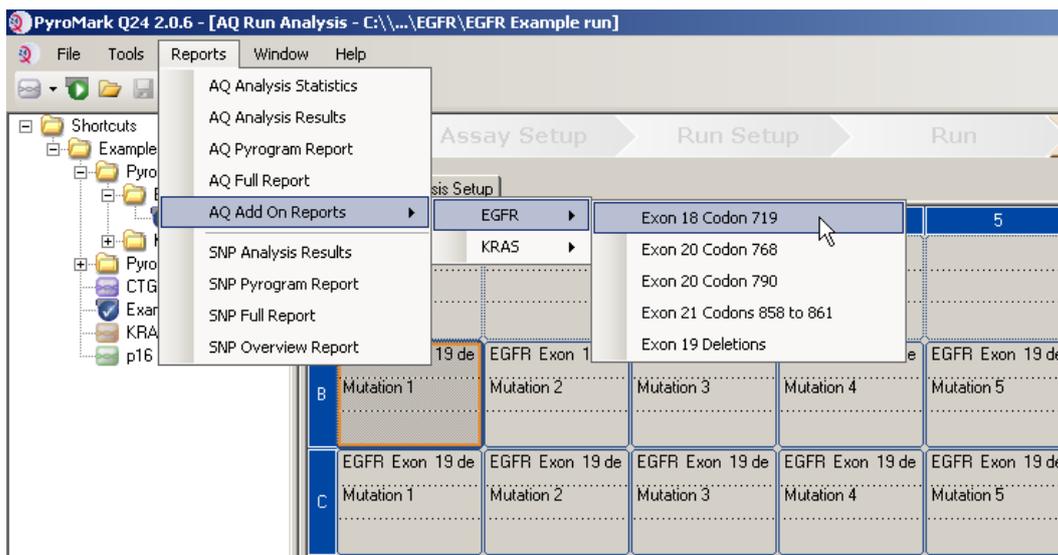
### Procedimento

1. **Insira o pen drive contendo o arquivo de execução processado na porta USB do computador.**
2. **Mova o arquivo de execução do pen drive para o local desejado no computador usando o Windows Explorer.**
3. **Abra o arquivo de execução no modo AQ do PyroMark Q24 Software selecionando "Open" (Abrir) no menu "File" (Arquivo) ou clicando duas vezes no arquivo (👉) no atalho do navegador.**
4. **Existem dois métodos para analisar a execução. Se estiver usando o EGFR Plug-in Report, vá para a etapa 5. Se estiver usando a análise AQ integrada do PyroMark Q24, vá para a etapa 6.**

**Nota:** Recomendamos fortemente o uso do EGFR Plug-in Report para a interpretação dos resultados. O EGFR Plug-in Report pode ser obtido por e-mail através de [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com). Esse relatório garante que os respectivos valores de LOD e as diferentes "Sequences to Analyze" (Sequências a serem analisadas) são usadas para detectar automaticamente todas as mutações e deleções, incluindo a identificação de vinte deleções diferentes e mutações complexas no Éxon 19.

### 5. Usando o EGFR Plug-in Report:

**Selecione "AQ Add On Reports/EGFR" (Relatórios do complemento AQ/EGFR) e "Exon 18 Codon 719" (Éxon 18 Códon 719) ou "Exon 19 Deletions" (Deleções do éxon 19) ou "Exon 20 Codon 768" (Éxon 20 Códon 768) ou "Exon 20 Codon 790" (Éxon 20 Códon 790) ou "Exon 21 Codons 858 to 961" (Éxon 21 Códon 858 a 961) em "Reports" (Relatórios) no menu (Figura 5).**



**Figura 5. A tela AQ Run Analysis (Análise de execução AQ).**

Os poços serão analisados automaticamente para averiguar todas as mutações para as quais o LOD é fornecido na Tabela 8. Os resultados serão apresentados em uma tabela de visão geral (Figura 6), seguidos por resultados detalhados, que incluem Pyrograms e a qualidade da análise.

### Summary

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

⚠ See detailed results for further explanation.

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

**Figura 6. A tabela de resumo de resultados.**

## 6. Usando a análise AQ:

**Para analisar a execução EGFR e obter uma visão geral dos resultados, clique em um dos botões de análise.**



Analise todos os poços.



Analise o poço selecionado.

Os resultados da análise (frequências de alelos) e a avaliação de qualidade são exibidos acima da posição variável na curva de Pyrogram®. Para obter mais detalhes sobre como analisar uma execução, consulte o *Manual do usuário do PyroMark Q24*.

**Para gerar um relatório, selecione "AQ Full Report" (Relatório completo AQ) ou "AQ Analysis Results" (Resultados de análise AQ) no menu "Reports" (Relatórios).**

**Nota:** O padrão "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada), tal como definido em Configuração de análise aborda as mutações mais frequentes em códons 719, 768, 790, 858 e 861 e a deleção mais frequente no éxon 19 (consulte o Anexo A, na página 54). Se uma amostra contiver uma mutação menos frequente, a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) pode ser alterada para analisar também o status da mutação nessa posição, conforme descrito no Anexo A.

As frequências de mutações atualizadas no gene EGFR humano são fornecidas online pelo Instituto Sanger em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

**Nota:** Para obter resultados confiáveis, recomendamos alturas de pico individuais acima de 20 RLU para o ensaio do códon 768 e acima de 30 RLU durante os quatro dias restantes. Defina 20 ou 30 RLU, respectivamente, como "required peak height for passed quality" (altura de pico necessária para qualidade aprovada) na configuração do ensaio (consulte o *Manual do usuário do PyroMark Q24* e o Anexo A).

**Nota:** Para permitir a quantificação adequada do códon 719 e códon 790, ajuste as alturas das barras do histograma na configuração do ensaio (Consulte o Anexo A, na página 54).

**Nota:** O relatório "AQ Analysis Results" (Resultados de análise AQ) deve ser usado para documentação e interpretação da quantificação de alelos. Os números mostrados no Pyrogram são arredondados e não mostram a quantificação exata.

**Nota:** O Pyrogram deve ser sempre comparado com o histograma, que pode ser exibido clicando com o botão direito na janela Pyrogram. Os picos medidos devem corresponder à altura das barras do histograma.

### **Reanálise de amostras sem mutação detectada com o padrão "Sequence to analyze" (Sequência a ser analisada) ou com a avaliação de qualidade "Check" (Verificado) ou "Failed" (Falha)**

Recomendamos fortemente uma reanálise de todas as amostras sem mutação detectada com o padrão "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada), bem como de todas as amostras cujo resultado tenha sido "Check" (Verificado) ou "Failed" (Falha) na avaliação de qualidade. As avaliações de qualidade "Check" (Verificado) ou "Failed" (Falha) podem indicar uma mutação em outra posição, resultando em picos de referência inesperados.

Para reanalisar e marcar mutações menos frequentes, vá para "Analysis Setup" (Configuração de análise) e altere "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) para as variantes descritas no Anexo A ou as variantes de outras mutações raras ou inesperadas. Clique em "Apply" (Aplicar) e, em seguida, clique em "To All" (A todos) quando a janela "Apply Analysis Setup" (Aplicar configuração de análise) é exibida.

**Nota:** Depois de alterar a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada), certifique-se de que o limiar de altura de pico individual e a altura das barras do histograma estejam ajustados em conformidade (Consulte Anexo A, na página 54).

**Nota:** Se os picos medidos não corresponderem à altura das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras ou inesperadas, o resultado não poderá ser usado como base para avaliação do status mutacional. É recomendável executar novamente a amostra.

## Interpretação dos resultados

### Interpretação dos resultados de análise e detecção de mutações de nível baixo

É altamente recomendável que uma amostra com DNA de controle não metilado seja incluída em cada execução para comparação e como um controle dos níveis de fundo. A frequência medida da amostra de controle deve ser inferior ou igual ao limite de branco (Limit Of Blank, LOB).

Todas as amostras devem ser analisadas com relação ao limite de detecção (LOD, consulte a Tabela 8) e interpretadas da seguinte maneira.

- Frequência de mutação  $< LOD$ : Tipo selvagem
- Frequência de mutação  $\geq LOD$  e  $\leq LOD + 3\%$  de unidades: Mutação potencial de baixo nível

**Nota:** Se estiver usando o Plug-in Report (consulte a etapa 5 do "Protocolo 6: Execução Analysis of a PyroMark Q24", na página 29) e isso ocorrer, será emitido um aviso.

As amostras com indicação de um potencial de mutação de nível baixo apenas devem ser consideradas positivas para a mutação se confirmadas por uma nova execução em duplicado, em conjunto com uma amostra com DNA de controle não metilado. O resultado de ambos os duplicados deve ser  $\geq LOD$  e diferente da amostra de controle. Caso contrário, a amostra deve ser avaliada como sendo de tipo selvagem.

- Frequência de mutação  $> LOD + 3\%$  de unidades: Mutação

Se estiver usando o EGFR Plug-in Report, isso é realizado automaticamente.

**Nota:** Recomenda-se o uso do EGFR Plug-in Report para a interpretação dos resultados. Para uma análise mais detalhada das amostras com potencial de mutação de nível baixo, recomendamos que a amostra também seja analisada manualmente no software do aplicativo (por ex., para comparação com a frequência mutacional da amostra de controle).

**Nota:** Uma frequência medida acima do LOB na amostra de controle indica um nível de fundo superior ao usual na respectiva execução, o que pode impactar a quantificação dos alelos, especialmente para níveis de mutação baixos. Nesse caso, as frequências medidas no intervalo de LOD (Tabela 8) a  $LOD + 3\%$  de unidades não podem ser usadas como base para avaliação do status mutacional. É recomendável executar novamente as amostras com um potencial de mutação de nível baixo.

**Nota:** A decisão quanto ao tratamento para pacientes com câncer não deve ser baseada somente no status da mutação do EGFR.

**Tabela 8. LOB e LOD determinados para mutações específicas**

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

\* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de mutações somáticas em câncer), disponível online no Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

<sup>†</sup> O LOD para essas deleções no éxon 19 foi determinado adicionando seis desvios padrão de medições em branco ao valor LOB.

A tabela continua na próxima página

**Tabela 8. Continuação**

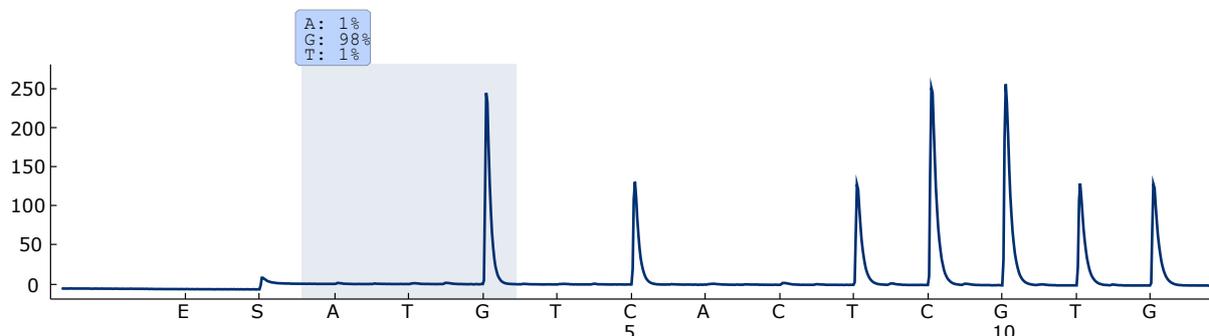
<b>Mutação</b>	<b>Substituição do amino-ácido</b>	<b>LOB (% uni-dades)</b>	<b>LOD (% uni-dades)</b>	<b>ID COSMIC* (V47)</b>
<b>Éxon 18 códon 719 (GGC)</b>				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
<b>Éxon 20 códon 768 (AGC)</b>				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
<b>Éxon 20 códon 790 (ACG)</b>				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
<b>Éxon 21 códon 858 (CTG)</b>				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) <sup>‡</sup>	6224
<b>Éxon 21 códon 861 (CTG)</b>				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

\* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de mutações somáticas em câncer), disponível online no Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

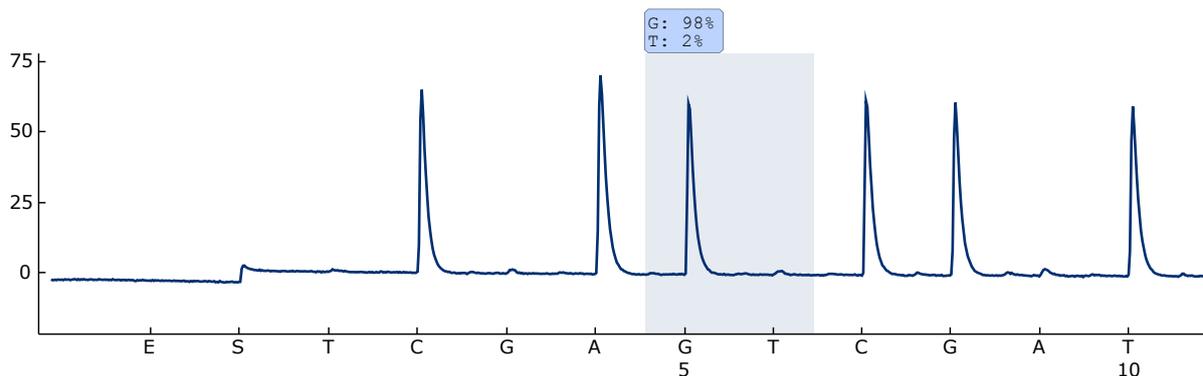
<sup>‡</sup> Nível mais baixo de mutação em uma amostra resultando em uma frequência medida  $\geq$ LOD.

## Resultados representativos

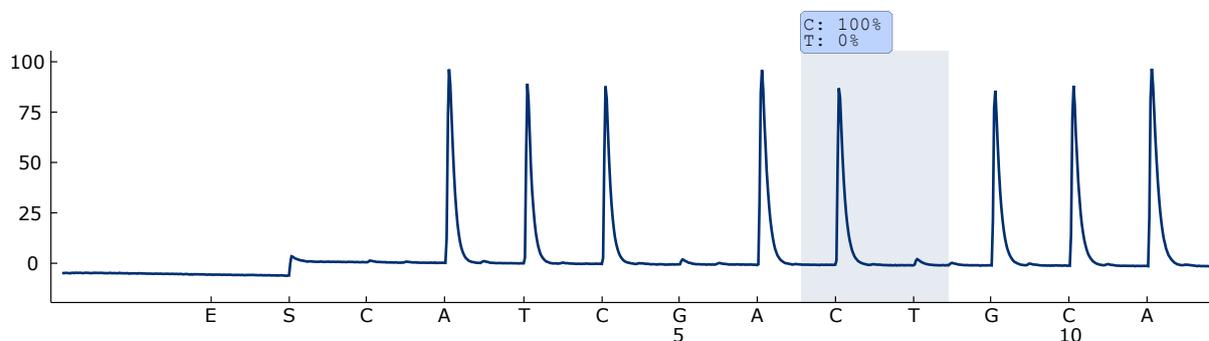
Os resultados representativos do Pyrogram são mostrados nas Figuras 7–14.



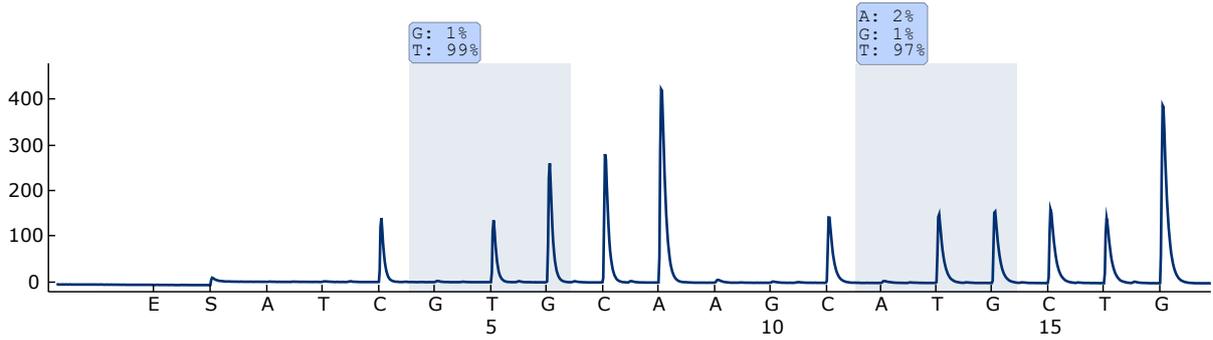
**Figura 7.** Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com um genótipo de tipo selvagem no códon 719 com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) DGCTCCGGTGC.



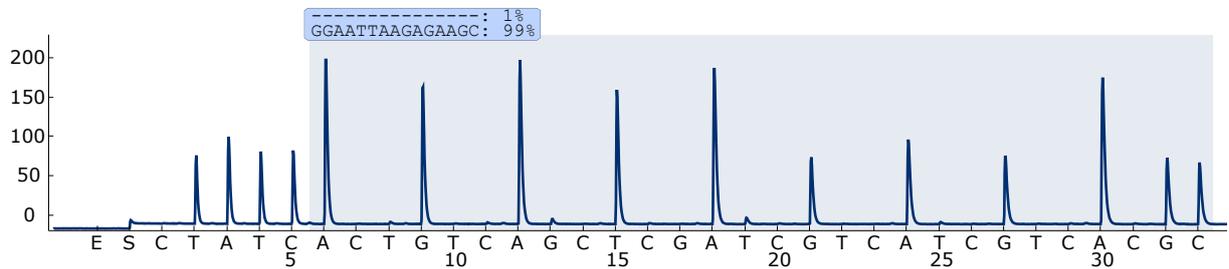
**Figura 8.** Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com um genótipo de tipo selvagem no códon 768 com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) CAKCGTG.



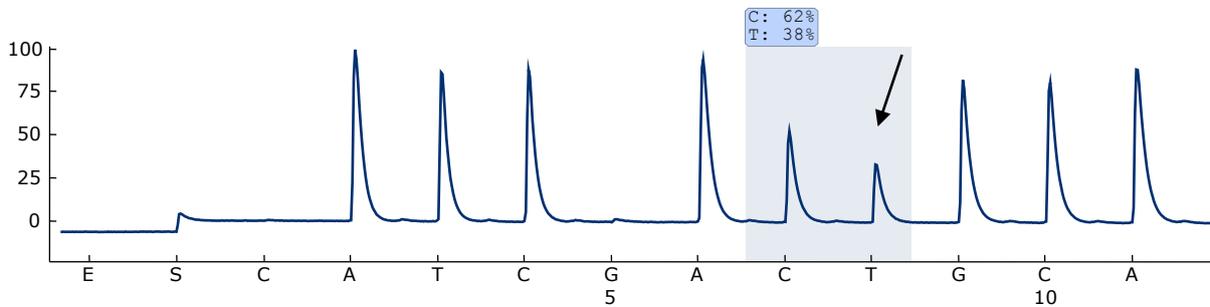
**Figura 9.** Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com um genótipo de tipo selvagem no códon 790 com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) ATCAYGCAG.



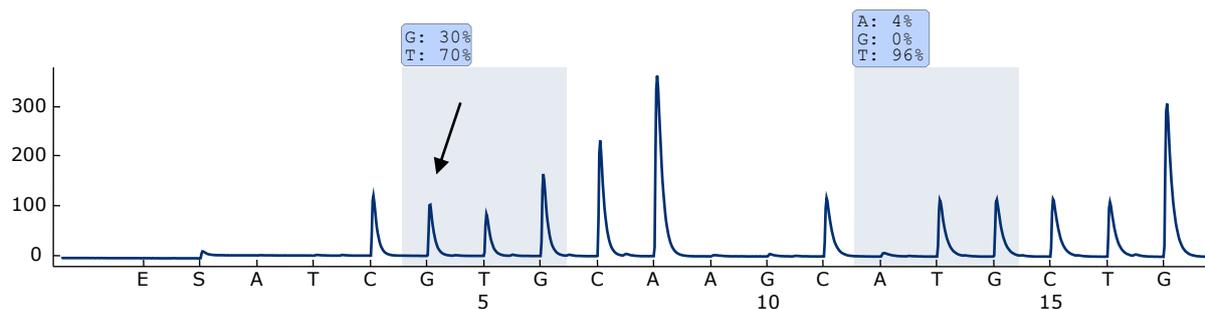
**Figura 10.** Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com um genótipo de tipo selvagem nos códons 858-861 com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) CKGGCCAAACDGCTGGGT.



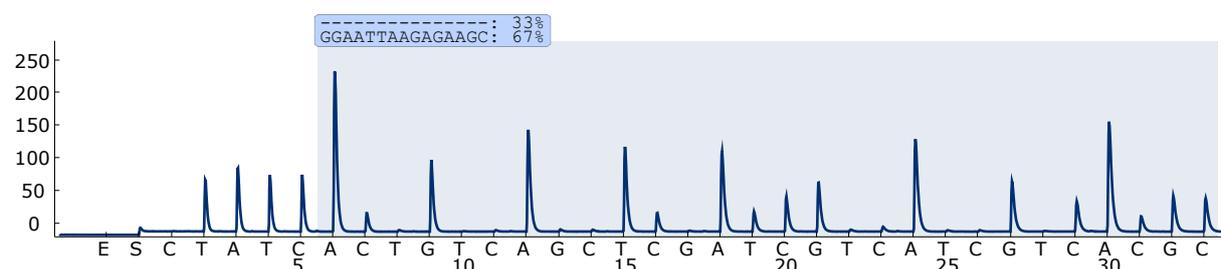
**Figura 11.** Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com um genótipo de tipo selvagem no éxon 19.



**Figura 12.** Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com uma mutação ACG → ATG na base 2 do códon 790 (indicado com uma seta).



**Figura 13.** Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com uma mutação CTG → CGG na base 2 do códon 858 (indicado com uma seta).



**Figura 14.** Curva de Pyrogram obtida após a análise de uma amostra com uma deleção 2235del15 no éxon 19.

## Guia de resolução de falhas

Este guia de resolução de falhas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico:

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://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, veja a contracapa ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Nota:** Consulte o *Manual do usuário do PyroMark Q24* para obter soluções de problemas gerais do instrumento.

### Comentários e sugestões

#### Sinais no controle sem modelo (controle negativo)

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| a) Interferência entre poços | O sinal de um poço é detectado em um poço adjacente. Evite colocar amostras com intensidades de sinal altas ao lado de poços de controle sem modelo.   |
| b) Contaminação da PCR       | Use ponteiros de pipetas estéreis com filtros. Armazene e extraia materiais, como amostras, controles e amplicons, separadamente dos reagentes de PCR. |

### Sequência fraca ou inesperada

- a) DNA genômico de baixa qualidade      O DNA genômico de baixa qualidade pode causar a falha da PCR. Analise amostras de PCR usando uma técnica de eletroforese (por exemplo, o QIAxcel<sup>®</sup> System ou a eletroforese em gel de agarose).

### Resultado "Check" (Verificado) ou "Failed" (Falha)

- a) Altura de pico baixa      Lidar com erros na configuração de PCR ou no preparo de amostras antes da Pyrosequencing pode resultar em picos baixos. Execute regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro conforme descrito no *Manual do usuário do PyroMark Q24* e troque as sondas de filtro quando indicado.
- No caso de um aviso "Check" (Verificado), compare cuidadosamente o Pyrogram com o histograma, que pode ser exibido clicando com o botão direito na janela Pyrogram. Se os picos medidos corresponderem à altura das barras do histograma, o resultado é válido. Caso contrário, é recomendável executar novamente a amostra.
- b) Mutação não definida em "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada)      Ajuste a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) na configuração do ensaio (consulte o Anexo A, na página 54) e reanalise a execução.
- c) Mutação rara inesperada      Um resultado "Check" (Verificado) ou "Failed" (Falha) na avaliação de qualidade pode ser causado por um padrão inesperado de picos. Isso pode indicar uma mutação inesperada, que não é analisada pela "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) fornecida. Essas amostras devem ser analisadas usando a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) alternativa, considerando mutações inesperadas.
- d) Aviso de desvio de altura de pico alto na distribuição x      O Pyrogram deve ser cuidadosamente comparado com o histograma, que pode ser exibido clicando com o botão direito na janela Pyrogram. Se os picos medidos não corresponderem à altura das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras, recomenda-se que a amostra seja executada novamente.

## Comentários e sugestões

---

- e) Mensagem de aviso "Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 8" (Incertou/falhou devido a desvio de altura de pico alto na distribuição: 8) aparece no ensaio códon 790
- Ruído de fundo na distribuição T8 está abaixo do nível esperado. Ajuste a altura da barra do histograma para o valor padrão (1,00, somente usando a ferramenta de análise integrada do PyroMark Q24 Software).
- f) Mensagem de aviso "Uncertain/Failed due to high peak height deviation at dispensation: 10." (Incerto/falhou devido a desvio de altura de pico alto na distribuição: 10.) aparece no ensaio códon 858-861.
- Uma mutação CTG>CGG de alto nível no códon 858 (L858R) pode resultar em aumento de resíduos nas distribuições G-10 e A-12 e uma frequência acima de LOD para a mutação ATG>CAG no códon 861 (L861Q). Neste caso, somente a mutação L585R relatada é válida e o aviso e a avaliação de qualidade "Check" (Verificado) podem ser descartados.
- Nota:** O EGFR Plug-in Report comunicará somente uma mutação (ou seja, a mutação com a maior frequência).
- g) Mensagem de aviso "Uncertain due to high peak height deviation at dispensation: 23." (Incerto devido a desvio de altura de pico alto na distribuição: 23.) aparece quando a deleção 2235del15 é comunicada.
- Uma deleção 2235del15 de alto nível pode resultar nesse aviso. Nesse caso, a mutação relatada é válida e o aviso e a avaliação de qualidade "Check" (Verificado) podem ser descartados.

## Comentários e sugestões

---

### Fundo alto

- |   |   |
|---|---|
| a) Armazenamento incorreto de nucleotídeos                                      | Armazene os nucleotídeos entre 2 e 8 °C. O armazenamento entre -15 e -25°C pode causar um aumento no fundo.                             |
| b) Encurte o tempo de resfriamento das amostras antes da análise Pyrosequencing | Mantenha as amostras no suporte da PyroMark Q24 plate em temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Não encurte o tempo de resfriamento. |
| c) Contaminação do cartucho   | Limpe com cuidado o cartucho conforme descrito na folha do produto. Armazene o cartucho protegido da luz e de poeira.                   |

### Nenhum sinal no controle positivo (DNA de controle não metilado)

- |  |   |
|--|---|
| a) Mistura de substrato ou enzimática insuficiente para todos os poços | Certifique-se de preencher o PyroMark Q24 Cartridge de acordo com as "Pre Run Information" (Informações de pré-execução) no menu "Tools" (Ferramentas).   |
| b) Reagentes incorretamente armazenados ou diluídos                    | Prepare os reagentes <i>therascreen</i> de acordo com as instruções no "Protocolo 5: Executando o PyroMark Q24", na página 27.  |
| c) Falha no preparo de amostras ou PCR                                 | Lidar com erros na configuração de PCR, na programação do ciclo de PCR ou no preparo de amostras antes da Pyrosequencing pode resultar na ausência de sinais. Execute o teste de funcionamento das sondas de filtro conforme descrito no <i>Manual do usuário do PyroMark Q24</i> e troque as sondas de filtro quando indicado. Repita a análise Pyrosequencing e de PCR. |

## **Controle de qualidade**

De acordo com o Sistema de Gestão de Qualidade da QIAGEN certificado pela ISO, cada lote do *therascreen* EGFR Pyro Kit é testado com relação a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade consistente do produto.

## **Limitações**

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados clínicos ou laboratoriais.

É responsabilidade do usuário validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos usados em seu laboratório que não sejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

## Características de desempenho

### Limite de branco e limite de detecção

O limite de branco (LOB) e o limite de detecção (Limit Of Detection, LOD) foram determinados para várias mutações usando misturas de plasmídeos (Tabela 9). O LOB e o LOD foram determinados de acordo com as recomendações na diretriz EP17-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protocolo para a determinação de limites de detecção e limites de quantificação; diretriz aprovada). Os erros  $\alpha$  e  $\beta$  (falso-positivo e falso-negativo, respectivamente) foram definidos para 5%. Para algumas deleções raras no éxon 19, o LOD foi determinado adicionando seis desvios padrão de medições em branco ao valor de LOB.

Os valores de LOB representam a frequência medida obtida com uma amostra de tipo selvagem. Os valores de LOD representam o sinal mais baixo (frequência medida) que pode ser considerado como positivo para a respectiva mutação.

### A mutação CTG → CGG no códon 858

Para a mutação CTG → CGG no códon 858, as medições de amostras com baixos níveis de mutação tiveram uma distribuição não Gaussiana. Portanto, o LOD foi determinado usando um método diferente, de acordo com as recomendações da Diretriz EP17-A do CLSI. O sinal mais baixo que indica a presença de mutação (LOD) nessas posições foi definido para 2 % de unidades acima do respectivo nível de linha de base, conforme definido pelo percentil 95 das medições em branco. Ao analisar uma amostra com um nível de mutação de 5,5%, 95% dos resultados (n=72) deram sinal de que podem ser considerados positivos ( $\geq$ LOD, isto é,  $\geq 2,6$  % de unidades).

**Tabela 9. LOB e LOD determinados para mutações específicas**

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

\* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de mutações somáticas em câncer), disponível online no Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

<sup>†</sup> O LOD para essas deleções no éxon 19 foi determinado adicionando seis desvios padrão de medições em branco ao valor LOB.

A tabela continua na próxima página

**Tabela 9. Continuação**

Mutação	Substituição do amino-ácido	LOB (% unidades)	LOD (% unidades)	ID COSMIC* (V47)
<b>Éxon 18 códon 719 (GGC)</b>				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
<b>Éxon 20 códon 768 (AGC)</b>				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
<b>Éxon 20 códon 790 (ACG)</b>				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
<b>Éxon 21 códon 858 (CTG)</b>				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) <sup>‡</sup>	6224
<b>Éxon 21 códon 861 (CTG)</b>				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

\* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de mutações somáticas em câncer), disponível online no Sanger Institute em [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

<sup>‡</sup> Nível mais baixo de mutação em uma amostra resultando em uma frequência medida  $\geq$ LOD.

**Nota:** Esses valores basearam-se em execuções onde misturas de plasmídeos que exibiam o tipo selvagem ou a respectiva sequência mutada foram usadas como modelo para a amplificação de PCR.

**Nota:** É recomendável que o desempenho do método seja confirmado no laboratório.

## Linearidade

A linearidade foi determinada usando misturas de plasmídeos que carregam o tipo selvagem ou a sequência mutante das mutações GGC>AGC códon 719, ACG>ATG no códon 790, CTG>CGG no códon 858 e as deleções 2235del15 e 2236del15 no éxon 19. Os plasmídeos foram misturados em diferentes proporções para fornecer quatro níveis de mutação (5, 10, 30 e 50%). Cada mistura foi analisada com três lotes diferentes do *therascreen* EGFR Pyro Kit em três execuções de Pyrosequencing com três réplicas cada.

Os resultados (n=9 para cada nível de mutação) foram analisados de acordo com a Diretriz EP6-A do CLSI "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Avaliação da linearidade dos procedimentos de medição quantitativa: uma abordagem estatística; diretriz aprovada) usando o Analyse-it® Software v2.21 e são mostradas na Figura 15 para a deleção 2235del15 no éxon 19.

Eles foram lineares dentro de uma não linearidade permitida de 5% de unidades no intervalo testado de 5 a 50% do nível de mutação. Resultados similares foram obtidos para as mutações GGC>AGC no códon 719, ACG>ATG no códon 790, CTG>CGG no códon 858, e a deleção 2236del15 no éxon 19.

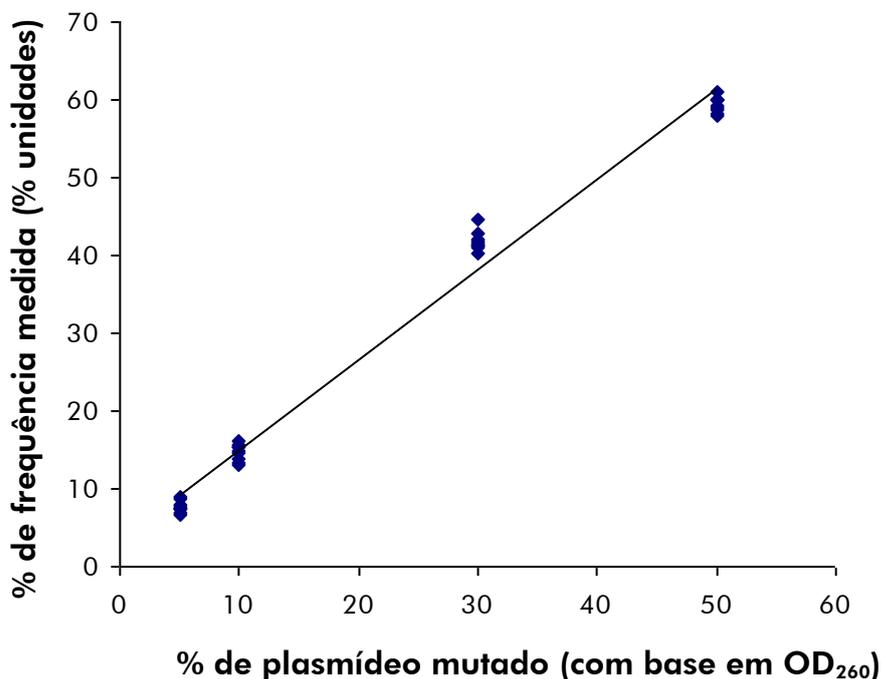


Figura 15. Linearidade da deleção 2235del15 no éxon 19.

## Precisão

Os dados de precisão possibilitam a determinação da variabilidade total dos ensaios e foram obtidos em três níveis diferentes pela análise das misturas de plasmídeos mencionadas acima com três réplicas cada.

A repetibilidade (variabilidade intraensaio e interlote) foi calculada com base nos dados para a determinação da linearidade (três execuções no mesmo dia usando diferentes lotes variáveis do *therascreen* EGFR Pyro Kit). A precisão intermediária (variabilidade intralaboratorial) foi determinada em três execuções em um laboratório, em três dias diferentes, por diferentes operadores, instrumentos PyroMark Q24 e lotes do *therascreen* EGFR Pyro Kit. A reprodutibilidade (variabilidade interlaboratorial) foi calculada a partir de duas execuções cada, em um laboratório interno e um laboratório externo, usando lotes variáveis do *therascreen* EGFR Pyro Kit.

As estimativas da precisão são expressas como um desvio padrão das frequências de mutação medidas em % de unidades (Tabela 10). A repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade para a deleção 2235del15 no éxon 19 foi

0,8–1,2, 0,7–2,9, e 0,7–1,8% de unidades, respectivamente, no intervalo medido de 5 a 50% do nível de mutação. Resultados similares foram obtidos para as mutações GGC>AGC no códon 719, ACG>ATG no códon 790, CTG>CGG no códon 858, e a deleção 2236del15 no éxon 19.

**Tabela 10. Precisão para a deleção 2235del15 no éxon 19\***

% de plasmídeo mutado <sup>†</sup>	Repetibilidade		Precisão intermediária		Reprodutibilidade	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
5	7,7	0,8	7,4	0,7	7,4	0,7
10	14,7	1,1	14,5	1,3	14,4	1,1
30	41,8	1,2	40,0	2,0	41,5	1,7
50	59,4	1,0	58,2	2,9	60,7	1,8

\* Todos os valores são fornecidos como % de unidades. DP: desvio padrão (n=9).

<sup>†</sup> Com base na medição OD<sub>260</sub>.

## Avaliação de diagnóstico

O *therascreen* EGFR Pyro Kit foi avaliado em comparação com o sequenciamento de Sanger e o *therascreen* EGFR RGQ Kit. O DNA foi extraído de 100 amostras de tumor fixados em formalina e conservadas em parafina (FFPE) contendo câncer de pulmão de células não pequenas (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) e analisado para mutações nos códons 719, 768, 790 e 858–861 e deleções e mutações complexas no éxon 19.

O DNA foi isolado usando o QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Foram realizadas análises com o *therascreen* EGFR Pyro Kit no PyroMark Q24, com o *therascreen* EGFR RGQ Kit no Rotor Gene-Q 5plex HRM série II e o sequenciamento de Sanger foi realizado no ABI® 3130 Genetic Analyzer.

Das 100 amostras analisadas, foi possível determinar o status mutacional para todos os códons e o éxon 19 em 97 amostras com todos os três métodos. Para duas amostras, o status mutacional do códon 768 não pode ser verificado pelo Pyrosequencing, e uma amostra falhou para a maioria dos códons com todos os três métodos, indicando que a qualidade do DNA era baixa demais para permitir a amplificação.

A mutação de resistência T790M foi detectada em uma das amostras com todos os três métodos enquanto a mutação L861Q foi detectada em somente uma amostra através de Pyrosequencing. Foram detectadas treze, doze e dezesseis deleções e mutações complexas em éxon 19 através de análises de Pyrosequencing, Rotor-Gene Q e sequenciamento de Sanger, respectivamente. Três das deleções do éxon 19 detectadas pelo sequenciamento de Sanger não puderam ser reproduzidas pela análise de Pyrosequencing e Rotor-Gene Q. A mutação L858R foi detectada em três amostras por todos os três métodos, em duas amostras através de Pyrosequencing e em qualquer um dos outros métodos, em uma amostra somente através de Pyrosequencing e em uma amostra somente através de análise de Rotor-Gene Q. Os resultados estão ilustrados nas Tabelas 11–14.

Nenhuma mutação foi detectada nos códons 719 e 768 nas 100 amostras, por qualquer um dos três métodos.

Excluindo amostras que falharam em um ou mais métodos, o *therascreen* EGFR Pyro Kit e o sequenciamento de Sanger apresentaram 100%, 98%, 99%, e 97% de concordância nos resultados para os códons 790, 858, 861 e éxon 19, respectivamente, enquanto o *therascreen* EGFR Pyro Kit e *therascreen* EGFR RGQ Kit apresentaram 100%, 97%, 99%, e 99% de concordância nos resultados para os códons 790, 858, 861 e éxon 19, respectivamente (Tabelas 11–14).

**Tabela 11. Resultados das amostras de tumor NSCLC analisadas para o códon 790**

		Sequenciamento de Sanger			
		Mutante	Tipo selvagem	Desconhecido	Total
therascreen <b>EGFR Pyro Kit</b>	<b>Mutante</b>	1	0	1	<b>2</b>
	<b>Tipo selvagem</b>	0	98	0	<b>98</b>
	<b>Desconhecido</b>	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>98</b>	<b>1</b>	<b>100</b>
therascreen <b>EGFR RGQ Kit</b>					
		Mutante	Tipo selvagem	Desconhecido	Total
		<b>Mutante</b>	1	0	1
therascreen <b>EGFR Pyro Kit</b>	<b>Tipo selvagem</b>	0	98	0	<b>98</b>
	<b>Desconhecido</b>	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>98</b>	<b>1</b>	<b>100</b>

**Tabela 12. Resultados das amostras de tumor NSCLC analisadas para o códon 858**

		Sequenciamento de Sanger			
		Mutante	Tipo selvagem	Desconhecido	Total
therascreen <b>EGFR Pyro Kit</b>	<b>Mutante</b>	4	2	0	<b>6</b>
	<b>Tipo selvagem</b>	0	93	0	<b>93</b>
	<b>Desconhecido</b>	0	0	1	<b>1</b>
	<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>95</b>	<b>1</b>	<b>100</b>
		therascreen <b>EGFR RGQ Kit</b>			
		Mutante	Tipo selvagem	Desconhecido	Total
therascreen <b>EGFR Pyro Kit</b>	<b>Mutante</b>	4	2	0	<b>6</b>
	<b>Tipo selvagem</b>	1	92	0	<b>93</b>
	<b>Desconhecido</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>95</b>	<b>0</b>	<b>100</b>

**Tabela 13. Resultados das amostras de tumor NSCLC analisadas para o códon 861**

		Sequenciamento de Sanger			
		Mutante	Tipo selvagem	Desconhecido	Total
therascreen EGFR Pyro Kit	Mutante	0	1	0	1
	Tipo selvagem	0	98	0	98
	Desconhecido	0	1	0	1
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
		therascreen EGFR RGQ Kit			
		Mutante	Tipo selvagem	Desconhecido	Total
therascreen EGFR Pyro Kit	Mutante	0	1	0	1
	Tipo selvagem	0	98	0	98
	Desconhecido	0	0	1	1
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>99</b>	<b>1</b>	<b>100</b>

**Tabela 14. Resultados das amostras de tumor NSCLC analisadas para o éxon 19**

		Sequenciamento de Sanger			
		Mutante	Tipo selvagem	Desconhecido	Total
therascreen EGFR Pyro Kit	Mutante	13	0	0	13
	Tipo selvagem	3	84	0	87
	Desconhecido	0	0	0	0
	<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>84</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
		therascreen EGFR RGQ Kit			
		Mutante	Tipo selvagem	Desconhecido	Total
therascreen EGFR Pyro Kit	Mutante	12	1	0	13
	Tipo selvagem	0	86	1	87
	Desconhecido	0	0	0	0
	<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>87</b>	<b>1</b>	<b>100</b>

**Nota:** Em todas as execuções usadas para a determinação das características de desempenho, o sinal era superior a 20 RLU para o ensaio códon 768 e acima de 30 RLU para os quatro ensaios restantes, conforme obtido rotineiramente a partir de 10 ng de DNA isolado de tecido fixado em formalina e conservado em parafina (FFPE). Os dados de Pyrosequencing foram analisados usando o EGFR Plug-in Report.

## Referências

A QIAGEN mantém um vasto banco de dados online atualizado de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem localizar os artigos que você precisa, pesquisando por uma única palavra-chave ou especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa de referências, visite o banco de dados de referência online da QIAGEN em [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) ou entre em contato com a Assistência técnica da QIAGEN ou o distribuidor local.

## Símbolos

 <N>	Contém reagentes suficientes para <N> testes
	Data de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Referência
	Número de lote
	Número de material
	Componentes
	Contém
	Número
	Hidróxido de sódio
	Número global de item comercial
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consulte as instruções de uso

## Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de suporte técnico em [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) ou contate um dos Departamentos da Assistência técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (veja o verso do manual ou visite-nos em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Anexo A: Configuração dos ensaios *therascreen* EGFR Pyro

Caso o EGFR Plug-in Report tenha sido instalado, estão disponíveis Assay Setups (Configurações de ensaio) predefinidas para os códons 719, 768, 790, e 858–861, e deleções de éxon 19 no atalho do navegador do PyroMark Q24 Software, no caminho "Example Files (Arquivos de exemplo)/PyroMark Setups (Configurações PyroMark)/EGFR". As seguintes etapas não necessitam ser realizadas. O EGFR Plug-in Report pode ser obtido por e-mail através de [pyro.plugin@qiagen.com](mailto:pyro.plugin@qiagen.com).

Recomendamos fortemente o uso do EGFR Plug-in Report ao invés da análise manual. As mutações complexas não podem ser manualmente adicionadas a uma "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) e têm de ser analisadas usando o plug-in. Após a instalação do plug-in ou sempre que um novo software for instalado ou atualizado no computador, a função correta do plug-in deve ser verificada conforme descrito no Guia rápido do plug-in EGFR (Plug-In Quick Guide).

Se o EGFR Plug-in Report não tiver sido instalado, o arquivo de ensaio deve ser configurado manualmente antes de executar o ensaio *therascreen* EGFR Pyro pela primeira vez. Configure o ensaio para os códons 719, 768, 790, códons 858–861 e deleções do éxon 19 do EGFR usando o PyroMark Q24 Software, conforme descrito abaixo.

### Procedimento

#### Códon 719 do EGFR

**A1. Clique em  na barra de ferramentas e selecione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).**

**A2. Insira a seguinte sequência em "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada).**

DGCTCCGGTG C

**Nota:** As mutações mais frequentes no códon 719 serão detectadas no nucleotídeo 2155 usando essa "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada).

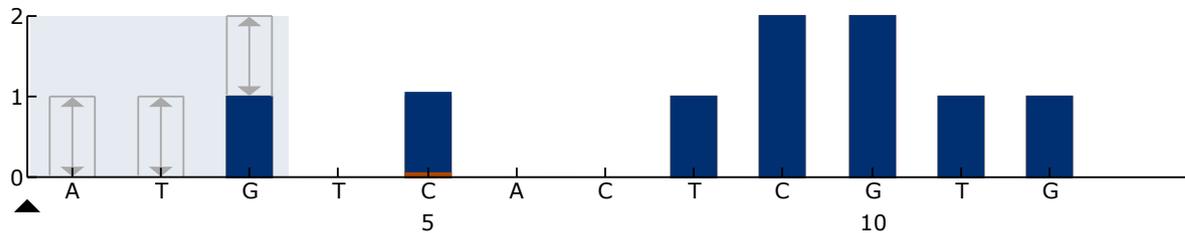
A "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) pode ser alterada após a execução para analisar mutações no nucleotídeo 2156. Para verificar se as mutações estão presentes no nucleotídeo 2156, altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) para a seguinte sequência.

GSCTCCGGTG C

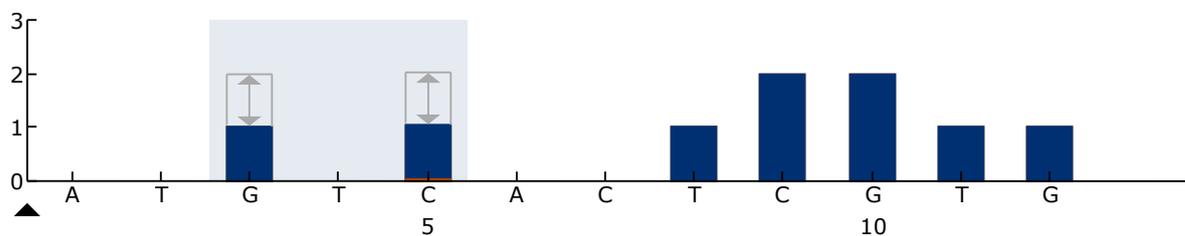
**Nota:** Certifique-se de que o limiar de pico individual esteja definido para 30 RLU. Além disso, certifique-se de que as alturas das barras de histograma estão ajustadas corretamente (consulte as instruções abaixo).

**A3. Insira manualmente o seguinte "Dispensation Order" (Pedido de distribuição).**

ATGTCACTCGTG



**Figura 16. Histograma para o códon 719 (nucleotídeo 2155) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) DGCTCCGGTGC. O retângulo vermelho na base da barra na distribuição C5 ilustra o ajuste de alturas da barra do histograma.**



**Figura 17. Histograma para o códon 719 (nucleotídeo 2156) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) GSCTCCGGTGC. O retângulo vermelho na base da barra na distribuição C5 ilustra o ajuste de alturas da barra do histograma.**

**A4. Clique na guia "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente o "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality" (Limiar da altura do pico - Altura do pico necessária para qualidade aprovada) para 30.**

**A5. No histograma, mova o ponteiro do mouse para a extremidade superior da barra na distribuição C5 e clique ao mesmo tempo que segura o botão "Ctrl". Uma pequena janela aparecerá exibindo a altura padrão da barra do histograma (1,00). Aumentar o nível de 1,04 para "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) DGCTCCGGTGC e de 2,04 para "Sequence to Analyze" GSCTCCGGTGC.**

**A6. Clique em  na barra de ferramentas e salve o ensaio como "códon 719 do EGFR".**

**Códon 768 do EGFR**

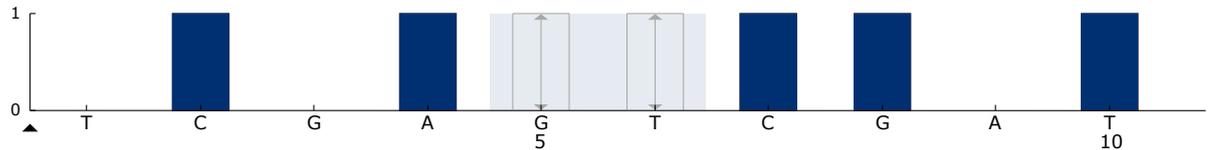
**A1. Clique em  na barra de ferramentas e selecione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).**

**A2. Insira a seguinte sequência em "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada).**

CAKCGTG

**A3. Adicione manualmente o seguinte "Dispensation Order" (Pedido de distribuição).**

TCGAGTCGAT



**Figura 18. Histograma para o códon 768 (nucleotídeo 2303) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) CAKCGTG.**

**A4. Clique em  na barra de ferramentas e salve o ensaio como "códon 768 do EGFR".**

### Códon 790 do EGFR

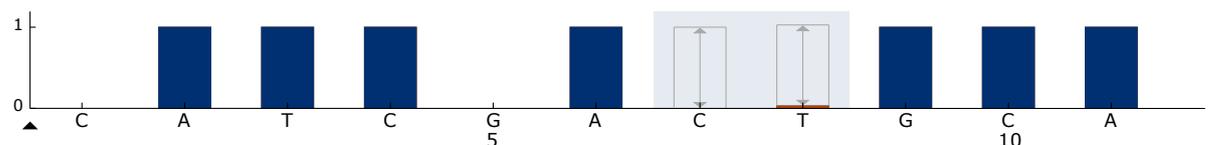
**A1. Clique em  na barra de ferramentas e selecione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).**

**A2. Insira a seguinte sequência em "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada):**

ATCAYGCAG

**A3. Adicione manualmente o seguinte "Dispensation Order" (Pedido de distribuição):**

CATCGACTGCA



**Figura 19. Histograma para o códon 790 (nucleotídeo 2369) com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) ATCAYGCAG. O retângulo vermelho na base da barra na distribuição T8 ilustra o ajuste de alturas da barra do histograma.**

**A4. Clique na guia "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente o "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Limiar da altura do pico - Altura do pico necessária para qualidade aprovada) para 30.**

**A5. No histograma, mova o ponteiro do mouse para a extremidade superior da barra na distribuição T8, e clique ao mesmo tempo que segura o botão "Ctrl". Uma pequena janela aparecerá exibindo a altura padrão da barra do histograma (1,00). Aumente o nível para 1,03.**

**A6. Clique em  na barra de ferramentas e salve o ensaio como "códon 790 do EGFR".**

### Códons 858-861 do EGFR

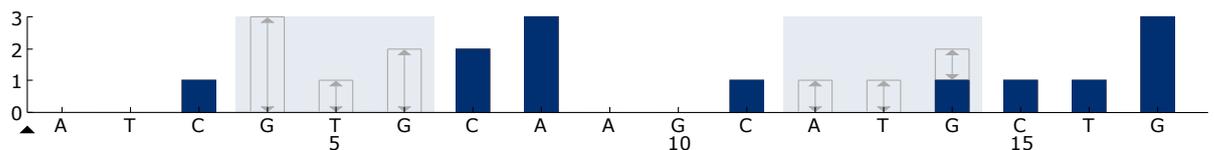
**A1. Clique em  na barra de ferramentas e selecione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).**

**A2. Insira a seguinte sequência em "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada):**

CKGGCCAAACDGCTGGGT

**A3. Adicione manualmente o seguinte "Dispensation Order" (Pedido de distribuição):**

ATCGTGCAAGCATGCTG



**Figura 20. Histograma para os códons 858 -861 com a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) CKGGCCAAACDGCTGGGT.**

**A4. Clique na guia "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente o "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Limiar da altura do pico - Altura do pico necessária para qualidade aprovada) para 30.**

**A5. Clique em  na barra de ferramentas e salve o ensaio como "códons 858-861 do EGFR".**

### Éxon 19 do EGFR del

**A1. Clique em  na barra de ferramentas e selecione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).**

**A2. Insira a seguinte sequência em "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada).**

TATCAA[GGAATTAAGAGAAGC]AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

A deleção mais frequente no éxon 19 é 2235del15. Para analisar outras deleções, a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) precisa ser trocada de acordo com cada deleção definida.

Use a sequência tipo selvagem:

TATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAA  
ATCCTCGAT e coloque colchetes no início e no fim das deleções.

Para a segunda deleção mais frequente no éxon 19 (2236del15), altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a ser analisada) para a seguinte.

TATCAAG[GAATTAAGAGAAGCA]ACATCTCCGAAAGCCAACAAGGA

**A3. Adicione manualmente o seguinte "Dispensation Order" (Pedido de distribuição).**

CTATCACTGTCAGCTCGATCGTCATCGTCACGC

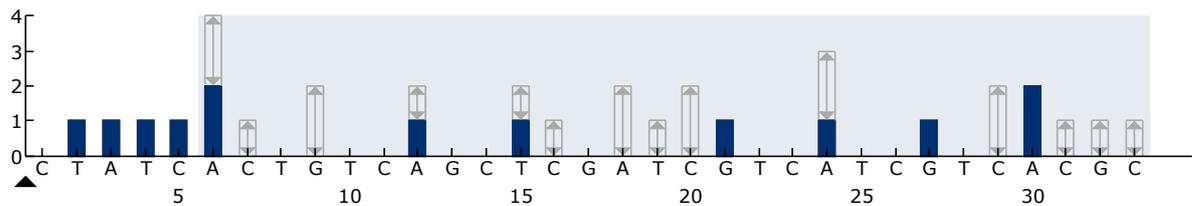


Figura 21. Histograma para éxon 19 del.

**A4. Clique na guia "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente o "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality" (Limiar da altura do pico - Altura do pico necessária para qualidade aprovada) para 30.**

**A5. Clique em  na barra de ferramentas e salve o ensaio como "Éxon 19 do EGFR del".**

## Anexo B: Esvaziando o contêiner de resíduos e os canais

<p><b>AVISO</b></p> 	<p><b>Produtos químicos perigosos</b></p> <p>A Denaturation Solution usada com a estação de trabalho de vácuo contém hidróxido de sódio, que pode causar irritação nos olhos e na pele.</p> <p>Sempre use jaleco, luvas e óculos de proteção.</p> <p>O responsável (por exemplo, o gerente do laboratório) deve tomar as precauções necessárias para garantir que os arredores da estação de trabalho estejam seguros e que os operadores do instrumento não sejam expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas (químicas ou biológicas) conforme definido nas folhas de dados de segurança (SDSs) ou nos documentos OSHA,* ACGIH† ou COSHH‡ aplicáveis.</p> <p>A expulsão de gases e o descarte de resíduos devem estar de acordo com todas as leis e regulamentos de saúde e segurança locais, estaduais e nacionais.</p>
---	---

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (EUA)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (EUA)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Reino Unido)

Certifique-se de observar os regulamentos ambientais locais, estaduais e federais quanto ao descarte de resíduos laboratoriais.

### Ponto importante antes de começar

- Este protocolo requer a utilização de água de alta pureza (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, [www.millipore.com](http://www.millipore.com), ou equivalente).

### Procedimento

#### **B1. Garanta que não seja aplicado vácuo à ferramenta de vácuo.**

**Certifique-se de que o vácuo esteja fechado (Off) e de que a bomba de vácuo esteja desligada.**

#### **B2. Descarte quaisquer soluções deixadas nos canais.**

#### **B3. Lave os canais com água de alta pureza ou os substitua, se necessário.**

#### **B4. Esvazie o contêiner de resíduos.**

**Nota:** A tampa pode ser removida sem desconectar o tubo.

#### **B5. Se a estação de trabalho de vácuo precisar ser limpa (por exemplo, devido a poeira ou derramamentos), siga as instruções no Manual do usuário do PyroMark Q24.**

## Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Ref.
<i>therascreen</i> EGFR Pyro Kit (24)	Para 24 reações em sistemas PyroMark Q24: Seq Primers, PCR Primers, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, Enzyme Mixture, Substrate Mixture, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP e H <sub>2</sub> O	971480
PyroMark Q24 MDx	Plataforma de detecção baseada em sequência para Pyrosequencing de 24 amostras em paralelo	900151 3
PyroMark Q24	Plataforma de detecção baseada em sequência para Pyrosequencing de 24 amostras em paralelo	900151 4
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation*	Estação de trabalho de vácuo (220 V) para o preparo de 24 amostras em paralelo, desde o produto de PCR até o modelo de fita simples	900151 7*
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Estação de trabalho de vácuo (220 V) para o preparo de 24 amostras em paralelo, desde o produto de PCR até o modelo de fita simples	900151 8
PyroMark Q24 MDx Software	Software de aplicativo	901906 3
PyroMark Q24 Software	Software de análise	901906 2
<b>Acessórios</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reação de sequenciamento de 24 poços	979301

\* Apenas Reino Unido.

† Resto do mundo.

<b>Produto</b>	<b>Conteúdo</b>	<b>Ref.</b>
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para distribuição de nucleotídeos e reagentes	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas de filtro reutilizáveis para a estação de trabalho a vácuo PyroMark Q96 e Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Para verificação de instalação do sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para confirmação de desempenho do sistema	979304
<b>Produtos relacionados</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparações de DNA: 50 colunas QIAamp MinElute®, Proteinase K, tampões, tubos de coleta (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Para 48 preparações: Reagent Cartridges (Tissue) (Cartuchos de reagentes [Tecido]), Disposable Filter-Tips (Ponteiras com filtro descartáveis), Disposable Tip-Holders (Suportes de ponteiras descartáveis), Sample Tubes (Tubos de amostra) (2 ml), Elution Tubes (Tubos de eluição) (1,5 ml), Buffer G2 (Tampão G2), Proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparações: colunas giratórias QIAamp Mini, tampões, reagentes, tubos, VacConnectors	61104

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](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados à Assistência técnica da QIAGEN ou ao distribuidor local.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

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

#### **Acordo de licença limitada**

A utilização deste produto implica a aceitação por parte de qualquer comprador ou usuário do *therascreen* EGFR Pyro Kit dos termos seguintes:

1. O *therascreen* EGFR Pyro Kit somente poderá ser usado em conformidade com o *Manual do theascreen EGFR Pyro Kit* e apenas com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo da sua propriedade intelectual nem incorpora os componentes deste kit com nenhum componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito no *Manual do theascreen EGFR Pyro Kit* e nos protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Esse kit e seus componentes são 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 kit concordam em não tomar ou permitir que qualquer outra pessoa tome medidas que possam levar a ou facilitar qualquer um dos atos acima proibidos. 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, veja [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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

**Australia** ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

