

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

Versão 1

Σ 24

IVD

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Para utilização com o equipamento Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



REF

870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, UK

R4

MAT

1063321PT



Tecnologias de amostras e testes da QIAGEN

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostras e testes, permitindo isolar e detectar o conteúdo de qualquer amostra biológica. Os avançados produtos e serviços de elevada qualidade da nossa empresa garantem o sucesso, desde a amostra até ao resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Testes de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microRNA e RNAi
- Automatização de tecnologias de amostras e testes

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite-nos em www.qiagen.com.

Conteúdo

| | |
|---|-----------|
| Utilização prevista | 5 |
| Resumo e explicação | 5 |
| Princípio do procedimento | 6 |
| Materiais fornecidos | 9 |
| Conteúdo do kit | 9 |
| Materiais necessários mas não fornecidos | 10 |
| Advertências e precauções | 11 |
| Informações de segurança | 11 |
| Precauções gerais | 11 |
| Armazenamento e manuseamento de reagentes | 12 |
| Armazenamento e manuseamento de amostras | 13 |
| Procedimento | 13 |
| Determinação do nível de células tumorais necessário para análise de EGFR13 | |
| Isolamento de ADN | 14 |
| Protocolo: Avaliação de amostras | 15 |
| Protocolo: Detecção de mutações EGFR | 18 |
| Protocolo: Configuração do Rotor-Gene Q EGFR | 21 |
| Interpretação de resultados | 30 |
| Análise de dados de avaliação de amostras | 30 |
| Análise de dados de mutação EGFR | 34 |
| Guia de resolução de problemas | 45 |
| Controlo de qualidade | 47 |
| Limitações | 47 |
| Características de desempenho | 47 |
| Cut-offs | 47 |
| Limite de detecção (LOD) | 48 |
| Precisão | 48 |
| Reprodutibilidade | 49 |
| Efeito da concentração do ADN de entrada | 49 |
| Substâncias interferentes | 50 |
| Bibliografia | 50 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Símbolos | 51 |
| Informações de contacto | 51 |
| Anexo: Dados das mutações | 52 |
| Informações para encomendar | 54 |

Utilização prevista

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR é um teste de diagnóstico *in vitro* que serve para detectar 29 mutações somáticas no gene relacionado ao cancro EGFR e proporciona uma avaliação qualitativa do estado da mutação.

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR deve ser utilizado por pessoal com a devida formação, num ambiente de laboratório profissional, com amostras de ADN fixadas em formalina e conservadas em parafina, extraídas de tecido de cancro do pulmão de não-pequenas células (NSCLC). Os resultados destinam-se a ajudar o médico a identificar doentes com NSCLC que possam beneficiar do tratamento com terapias de inibidores da tirosina quinase.

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

Resumo e explicação

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR é um kit pronto a usar para a detecção de 29 mutações somáticas no gene relacionado ao cancro EGFR, utilizando reacção de polimerização em cadeia (PCR) no equipamento Rotor-Gene Q.

Utilizando as tecnologias Scorpions® e ARMS®, o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR permite a detecção das seguintes mutações num fundo de ADN genómico de tipo selvagem.

- 19 deleções no exão 19 (detecta a presença de qualquer uma das 19 deleções, mas não as distingue)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (detecta a presença de G719S, G719A ou G719C, mas não os distingue)
- S768I
- 3 inserções no exão 20 (detecta a presença de qualquer uma de 3 inserções, mas não as distingue)

Os métodos utilizados são altamente selectivos e, consoante a quantidade total de ADN presente, permitem a detecção de uma percentagem baixa de material mutante num fundo de ADN genómico de tipo selvagem. Estes limites de detecção e selectividade são superiores a tecnologias como a sequenciação por terminador fluorescente.

Princípio do procedimento

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR utiliza duas tecnologias — a ARMS e a Scorpions — para a detecção de mutações de PCR em tempo real.

ARMS

A amplificação específica do alelo ou da mutação é obtida utilizando o ARMS (Amplification Refractory Mutation System). A polimerase *Taq* do ADN (*Taq*) é eficaz ao distinguir entre uma correspondência e uma não correspondência na extremidade de 3' de um iniciador da PCR. As sequências mutadas específicas são amplificadas de forma selectiva, mesmo nas amostras em que a maioria das sequências não exhibe a mutação. Quando se consegue uma correspondência total com o iniciador, a amplificação é efectuada com toda a eficácia. Quando a base de 3' não encontra correspondência, ocorre apenas a amplificação de fundo de baixo nível.

Scorpions

A detecção da amplificação é realizada utilizando a tecnologia Scorpions. As moléculas Scorpions são moléculas bifuncionais que contêm um iniciador da PCR ligado de forma covalente a uma sonda. O fluoróforo integrado nesta 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 separam-se. Isto origina um aumento da fluorescência do tubo de reacção.

Formato do Kit

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

- Um ensaio de controlo (Ctrl)
- Sete ensaios de mutação

Todas as misturas de reacção contêm reagentes para detectar alvos que estão etiquetados com FAM[™], e um ensaio de controlo interno etiquetado com HEX[™]. O ensaio de controlo interno pode detectar a presença de inibidores que podem dar origem a resultados falso-negativos. A amplificação FAM pode superar a amplificação do controlo interno e o objectivo do controlo interno é simplesmente mostrar que onde não existe amplificação FAM trata-se de um resultado verdadeiramente negativo e não de uma reacção PCR falhada.

Procedimento

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR inclui um procedimento de dois passos. No primeiro passo, é efectuado um ensaio de controlo para avaliar o ADN total de uma amostra. No segundo passo, são efectuados ensaios de mutação e de controlo para determinar a presença ou ausência de ADN mutado.

Ensaio:

Ensaio de controlo

O ensaio de controlo, etiquetado com FAM, é utilizado para avaliar o ADN total de uma amostra. Este ensaio amplifica uma região do exão 2 do gene EGFR. O iniciador e a sonda foram concebidos para evitar quaisquer polimorfismos conhecidos do EGFR.

Recomenda-se vivamente a utilização da Mistura de Reacção de Controlo (Ctrl) fornecida com o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR para avaliar o ADN total de uma amostra. O ensaio de controlo amplifica uma região do exão 2 do gene EGFR. Recomenda-se a preparação de amostras com apenas o ensaio de controlo a utilizar o Controlo Positivo (PC) EGFR como um controlo positivo e água isenta de nuclease (H₂O) como o controlo sem modelo.

Nota: A avaliação do ADN deverá basear-se na PCR e poderá diferir da quantificação baseada em leituras de absorção. É fornecida Mistura de Reacção de Controlo (Ctrl) adicional para permitir a avaliação da qualidade e quantidade do ADN nas amostras antes da análise com o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Ensaio de mutação

Cada ensaio de mutação contém uma sonda Scorpion etiquetada com FAM e um iniciador ARMS para discriminação entre o ADN de tipo selvagem e um ADN mutante específico.

Controlos

Nota: Todas as execuções experimentais devem conter os seguintes controlos.

Controlo positivo

Cada ensaio deve conter um controlo positivo nos tubos 1 a 8. O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR contém o Controlo Positivo (PC) EGFR, a utilizar como modelo na reacção do controlo positivo. Os resultados do controlo positivo serão avaliados para garantir que o kit tem um desempenho de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos.

Controlo negativo

Cada ensaio deve conter um controlo negativo (NTC “no template control” - sem controlo modelo) nos tubos 9 a 16. O NTC é constituído por água isenta de nuclease (H₂O) para ser utilizada como “modelo” para o controlo sem modelo. O controlo sem modelo é utilizado para avaliar qualquer potencial contaminação durante a configuração da execução e para avaliar o desempenho da reacção do controlo interno.

Avaliação da reacção do controlo interno

Cada mistura de reacção contém um controlo interno para além da reacção alvo. Uma falha indica que poderão haver inibidores presentes que podem originar resultados falsos-negativos ou que ocorreu um erro de configuração do operador para esse tubo.

Se a falha do controlo interno for devida a inibição da PCR, diluir a amostra pode reduzir o efeito dos inibidores, mas é necessário ter em atenção que a diluição também dilui o ADN alvo. A amplificação FAM pode superar a amplificação do controlo interno de modo que o valor C_T (HEX) do CI gerado poderá ficar fora do intervalo especificado. Os resultados do FAM ainda são válidos para estas amostras.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

| Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR | | | (24) |
|--|---|------------------|------------|
| Ref. ^a | | | 870111 |
| Número de reacções | | | 24 |
| Vermelho | Control Reaction Mix (Mistura da reacção de controlo) | Ctrl | 2 x 600 µl |
| Roxo | T790M Reaction Mix (Mistura de reacção de T790M) | T790M | 600 µl |
| Laranja | Deletions Reaction Mix (Mistura de reacção de deleções) | Del | 600 µl |
| Rosa | L858R Reaction Mix (Mistura de reacção L858R) | L858R | 600 µl |
| Verde | L861Q Reaction Mix (Mistura de reacção L861Q) | L861Q | 600 µl |
| Amarelo | G719X Reaction Mix (Mistura de reacção G719X) | G719X | 600 µl |
| Cinzento | S768I Reaction Mix (Mistura de reacção S768I) | S768I | 600 µl |
| Azul | Insertions Reaction Mix (Mistura de reacção de inserções) | Ins | 600 µl |
| Castanho | EGFR Positive Control (Controlo positivo EGFR) | PC | 300 µl |
| Turquesa | Taq DNA Polymerase (Polimerase Taq do AND) | Taq | 138 µl |
| Branco | Nuclease-Free Water (Água isenta de nuclease) | H ₂ O | 2 x 1,9 ml |
| therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook (manual em inglês) | | | 1 |

Materiais necessários mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (SDS) apropriadas, disponíveis no fornecedor do produto.

- Kit de isolamento de ADN (consulte “Isolamento de ADN”, página 14)
- Xileno
- Etanol (96–100%)*
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml ou 2 ml (para os passos de lise)
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (para os passos de eluição) (disponíveis da Brinkmann [Safe-Lock, ref.^o 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, ref.^o 0030 120.086] ou Sarstedt [Safety Cap, ref.^o 72.690])[†]
- Pipetas[‡] (ajustáveis) de uso exclusivo para a preparação de amostras
- Pipetas[‡] (ajustáveis) de uso exclusivo para a preparação de mistura principal de PCR
- Pipetas[‡] (ajustáveis) de uso exclusivo para distribuir o modelo de ADN*
- Pontas de pipeta isentas de DNase, RNase e ADN com filtros (para evitar contaminação cruzada, recomendamos pontas de pipeta com barreira para aerossóis)
- Termo-misturador, incubador orbital aquecido, bloco de aquecimento ou banho-maria com capacidade de incubação a 90 °C[‡]
- Centrífuga de bancada[‡] com rotor de tubos de reacção de 2 ml
- Vortex
- Equipamento 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 2.0.2 ou superior
- Tiras de tubos e tampas, 0,1 ml, para utilizar com rotor de 72 poços (Ref.^o 981103 ou 981106)

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

[†] Esta não é uma lista completa de fornecedores.

[‡] Certifique-se de que os equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

[§] Instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM, se aplicável.

Também denominado de Rotor-Gene Q MDx em alguns países.

- Tubos de microcentrifugação isentos de DNase, RNase e ADN para a preparação de misturas principais
- Bloco de alumínio para a configuração de reacção manual com uma pipeta de canal único em bloco de carregamento de 72 tubos de 0,1 ml (QIAGEN, ref.ª 9018901)

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Informações de segurança

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (SDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as MSDS de cada kit QIAGEN e componente do kit.

Informações de emergência 24 horas

Emergência química ou assistência a acidentes disponível 24 horas por dia por parte de:

CHEMTREC

EUA e Canadá ■ Tel.: 1-800-424-9300

Fora dos EUA e Canadá ■ Tel.: +1-703-527-3887 (aceites chamadas a cobrar no destino)

Precauções gerais

O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- Utilize pontas de pipetas isentas de DNase, RNase e ADN com filtros e certifique-se de que as pipetas foram calibradas de acordo com as instruções do fabricante.
- Armazene e extraia materiais positivos (amostras e controlos positivos) separadamente de todos os reagentes restantes e adicione-os à mistura de reacção numa instalação em separado.
- Descongele completamente todos os componentes à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar um ensaio.
- Quando estiverem descongelados, misture os componentes invertendo cada tubo 10 vezes e centrifugue com brevidade.

Nota: Tenha muito cuidado para evitar a contaminação das PCRs com o material de controlo sintético. Recomenda-se a utilização de pipetas em separado, de uso exclusivo, para preparar as misturas de reacção e adicionar o modelo de ADN. A preparação e distribuição das misturas de reacção têm de ser efectuadas numa área diferente daquela onde se adiciona o modelo. Para evitar contaminação laboratorial com produtos de pós PCR, os tubos do Rotor-Gene Q não devem ser abertos depois de terminada a execução de PCR.

Nota: Os reagentes estão validados para configuração manual. Se for utilizado um método automático, tal poderá reduzir o número de reacções possíveis devido ao reagente necessário para encher os “volumes mortos” desses equipamentos.

Nota: Todos os reagentes do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR foram formulados especificamente para serem utilizados com os testes indicados. Todos os reagentes fornecidos no Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR destinam-se a ser utilizados unicamente com os outros reagentes no mesmo Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Para se manter um nível de desempenho ideal, não se deve substituir os reagentes do kit.

Nota: Utilize apenas a polimerase *Taq* de ADN (*Taq*) fornecida no kit. Não substitua com polimerase *Taq* de ADN de outros kits do mesmo tipo ou de qualquer outro tipo, ou com polimerase *Taq* de ADN de outro fornecedor.

Nota: Os reagentes para o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR foram diluídos a uma concentração ideal. Não se recomenda a diluição adicional dos reagentes, pois pode resultar numa redução do seu desempenho. Não se recomenda a utilização de volumes de reacção inferiores a 25 µl, uma vez que tal aumentaria o risco de falsos-negativos.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR foi expedido em gelo seco e tem de chegar ao seu destino em estado ainda congelado. Se o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR não chegar ao destino em estado congelado, se a embalagem exterior tiver sido aberta durante o transporte, ou se a remessa não contiver uma nota de embalagem, o manual ou os reagentes, contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica QIAGEN ou os distribuidores locais (consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR deverá ser armazenado imediatamente após ser recebido, a uma temperatura entre –15 °C e –25 °C num congelador de temperatura constante e protegido da luz. Quando armazenado nas condições de armazenamento recomendadas e na sua embalagem original, o kit permanecerá estável até à data do prazo de validade indicado no rótulo. Deve-se evitar a repetição de congelamento e descongelamento. Recomendamos um máximo de 7 ciclos de congelamento/descongelamento.

Nota: Para assegurar um nível óptimo de actividade e desempenho, as moléculas Scorpions (tal como todas as moléculas etiquetadas com fluorescência) devem estar protegidas da luz para evitar a sua foto-descoloração.

Nota: Para obter uma utilização optimizada dos reagentes do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, as amostras deverão estar em lotes. Se as amostras forem testadas individualmente, serão utilizados mais reagentes e diminuirá o número de amostras que podem ser testadas com o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Armazenamento e manuseamento de amostras

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

O material das amostras deve ser ADN genómico humano, extraído de amostras de tumor do pulmão de não-pequenas células, fixadas em formalina e conservadas em parafina (FFPE). As amostras devem ser transportadas de acordo com a metodologia de patologia normal, para assegurar a qualidade das amostras.

As amostras de tumores são não homogéneas e os dados de uma amostra de um tumor podem não corresponder aos dados de outras secções do mesmo tumor. As amostras de tumor podem também conter tecido não tumoral. Não se prevê que o ADN de tecido não tumoral contenha as mutações de EGFR detectadas pelo Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Procedimento

Determinação do nível de células tumorais necessário para análise de EGFR

O tecido utilizado para análise de EGFR é tecido de cancro do pulmão de não-pequenas células (NSCLC), fixado em formalina e conservado em parafina (FFPE). O ADN extraído de células deste tecido tumoral poderá ser de tipo selvagem com respeito a mutações de EGFR ou poderá exibir uma ou mais mutações.

O tecido FFPE de NSCLC utilizado para a extracção poderá conter também tecido normal não tumoral, que será de tipo selvagem com respeito a mutações de EGFR. O ADN de tipo selvagem deste tecido pode diluir o ADN mutante, potencialmente para um nível em que já não é detectável pelo kit. No entanto, recomenda-se que mesmo amostras de baixos níveis de tumor sejam testadas, pois há potencial para que mutações de alto nível sejam detectadas e seja tomada uma decisão de tratamento do doente.

Para maximizar a probabilidade de detectar mutações, proceda da maneira indicada a seguir.

- Utilize coloração de hematoxilina-eosina (H&E) em pelo menos uma lâmina de cada amostra de doente.
- Certifique-se de que um patologista examina a lâmina corada relativamente a presença de tumor.
- Se possível o patologista deverá examinar várias lâminas de todo o bloco FFPE.
- Todas as amostras com tumor presente podem ser testadas com o kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Isolamento de ADN

O isolamento de ADN deve ser realizado utilizando o Kit QIAamp® DNA FFPE Tissue.

Efectue a purificação do ADN de acordo com as instruções no Manual do kit QIAamp DNA FFPE Tissue (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) com as seguintes alterações:

- Faça a colheita de secções de FFPE em lâminas de vidro.
- Raspe o excesso de parafina em redor das secções de tecido utilizando um bisturi esterilizado novo.
- Raspe as secções de tecido para tubos de microcentrifugação, utilizando um bisturi diferente para cada amostra a extrair.
- A digestão de Proteinase K deve ser efectuada durante 1 hora.
- O ADN genómico purificado tem de ser eluído em 200 µl de tampão ATE (fornecido no kit QIAamp DNA FFPE Tissue).
- Armazene o ADN genómico purificado entre –15 e –30 °C
- Quando houver informação disponível, deverão ser utilizadas as lâminas adjacentes à lâmina com coloração de H&E com maior conteúdo tumorigénico.

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

Protocolo: Avaliação de amostras

Este protocolo é utilizado para avaliar o ADN total amplificável em amostras.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- Antes de iniciar o procedimento, leia “Precauções gerais”, na página 11.
- Familiarize-se durante algum tempo com o Rotor-Gene Q antes de iniciar o protocolo. Consulte o manual de utilizador do equipamento.
- Não misture com agitação forte a polimerase *Taq* do ADN (*Taq*) nem qualquer mistura que contenha polimerase *Taq* do ADN (*Taq*), pois isso pode desactivar a enzima.
- Pipete a polimerase *Taq* do ADN (*Taq*) colocando a ponta da pipeta ligeiramente abaixo da superfície do líquido para evitar que a ponta seja revestida com excesso de enzima.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Antes de cada utilização, todos os reagentes devem ser completamente descongelados à temperatura ambiente (15 a 25 °C), misturados invertendo 10 vezes e centrifugados com brevidade para recolher o conteúdo no fundo do tubo.
- Deixe que a polimerase *Taq* do ADN (*Taq*) alcance a temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de cada utilização. Centrifugue o tubo com brevidade para recolher a enzima no fundo do tubo.

Procedimento

1. **Descongele a mistura de reacção de controlo (Ctrl), a água isenta de nuclease para controlo sem modelo (NTC) e o Controlo Positivo (PC) EGFR à temperatura ambiente (15 a 25 °C). Quando os reagentes estiverem descongelados, misture-os invertendo cada tubo 10 vezes para evitar concentrações localizadas de sais e, em seguida, centrifugue com brevidade para recolher o conteúdo no fundo do tubo.**
2. **Prepare misturas principais suficientes para as amostras de ADN, uma reacção de controlo positivo e uma reacção de controlo sem modelo (NTC), de acordo com os volumes indicados no Quadro 1. Inclua reagentes para 1 amostra suplementar para permitir uma quantidade extra suficiente para a configuração da PCR.**

A mistura principal contém todos os componentes necessários para a PCR, excepto a amostra.

Quadro 1. Preparação da mistura principal do ensaio de controlo*

| Componente | Volume/reacção (µl) |
|---|---------------------|
| Mistura de reacção de controlo (Ctrl) | 19,5 |
| Polimerase <i>Taq</i> do ADN (<i>Taq</i>) | 0,5 |
| Volume total | 20,0 |

* Ao preparar a mistura principal, prepare em quantidade suficiente para uma amostra suplementar.

- Misture muito bem a mistura principal, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo 10 vezes. Adicione imediatamente 20 µl de mistura principal a um tubo de tira PCR (não fornecido).**
Nota: Para a avaliação da amostra, deverá ser adicionada mistura principal do ensaio de controlo a um poço de controlo positivo, um poço de controlo negativo e um poço de cada amostra.
- Adicione imediatamente 5 µl de amostra de água isenta de nuclease (H₂O) ao tubo de controlo sem modelo (tubo de PCR número 9) e coloque a tampa no tubo. Adicione 5 µl de ADN da amostra aos tubos de amostra e coloque-lhes as tampas. Adicione 5 µl de Controlo Positivo (PC) EGFR ao tubo do controlo positivo (tubo 1 da PCR) e coloque a tampa no tubo.**
- Coloque os tubos de tira PCR nas posições adequadas no rotor e certifique-se visualmente de que todos os tubos contêm um volume igual.**
Nota: Certifique-se de que os tubos de tira não estão invertidos quando os transferir para o rotor.
- Se o rotor não ficar totalmente ocupado, preencha os espaços restantes com tubos vazios com tampa.**
- Coloque imediatamente o rotor de 72 poços no equipamento Rotor-Gene Q 5plex HRM. Certifique-se de que o anel de aperto (acessório do equipamento Rotor-Gene Q) é colocado por cima do rotor para prender os tubos durante a execução.**
- Consulte a configuração do equipamento Rotor-Gene Q (consulte “Protocolo: Configuração do Rotor-Gene Q EGFR”, na página 21) para criar o perfil de temperatura e iniciar a execução.**

Quadro 2. Parâmetros de ciclagem

| Ciclos | Temperatura | Tempo | Aquisição de dados |
|--------|-------------|-------------|--------------------|
| 1 | 95 °C | 15 minutos | Nenhum |
| 40 | 95 °C | 30 segundos | Nenhum |
| | 60 °C | 60 segundos | Verde e amarelo |

9. Depois de terminada a execução, analise os dados de acordo com “Análise de dados de avaliação de amostras”, na página 30.

Protocolo: Detecção de mutações EGFR

Este protocolo serve para a detecção de mutações EGFR. Após uma amostra ser aprovada na avaliação da amostra, a mesma pode ser testada utilizando os ensaios de mutação EGFR.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- Antes de iniciar o procedimento, leia “Precauções gerais”, na página 11.
- Familiarize-se durante algum tempo com o Rotor-Gene Q antes de iniciar o protocolo. Consulte o manual de utilizador do equipamento.
- Não misture com agitação forte a polimerase *Taq* do ADN (*Taq*) nem qualquer mistura que contenha polimerase *Taq* do ADN, pois isso pode desactivar a enzima.
- Para a utilização eficiente do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, as amostras devem ser agrupadas em lotes de 7 para encher o rotor de 72 poços. A utilização de lotes mais pequenos faz com que possam ser testadas menos amostras com o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Pipete a *Taq* colocando a ponta da pipeta ligeiramente abaixo da superfície do líquido para evitar que a ponta seja revestida com excesso de enzima.
- Para cada amostra de ADN, os ensaios de mutação e de controlo têm de ser analisados na mesma execução de PCR, para evitar as variações de execução em execução.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Antes de cada utilização, todos os reagentes devem ser completamente descongelados à temperatura ambiente (15 a 25 °C), misturados invertendo 10 vezes e centrifugados com brevidade para recolher o conteúdo no fundo do tubo.
- Certifique-se de que a *Taq* está à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de cada utilização. Centrifugue o tubo com brevidade para recolher a enzima no fundo do tubo.

Procedimento

1. **Descongele as misturas de reacção, a água isenta de nuclease para controlo sem modelo (NTC) e o Controlo Positivo (PC) EGFR à temperatura ambiente (15 a 25 °C). Quando os reagentes estiverem descongelados, misture-os invertendo cada tubo 10 vezes para evitar concentrações localizadas de sais e, em seguida, centrifugue com brevidade para recolher o conteúdo no fundo do tubo.**

2. Prepare misturas principais suficientes para as amostras de ADN, uma reacção de controlo positivo e uma reacção de controlo sem modelo (NTC), de acordo com os volumes indicados no Quadro 3. Inclua reagentes para 1 amostra suplementar para permitir uma quantidade extra suficiente para a configuração da PCR.

A mistura principal contém todos os componentes necessários para a PCR, excepto a amostra.

Quadro 3. Preparação das misturas principais*

| Componente | Volume/reacção (µl) |
|---|---------------------|
| Mistura de reacção | 19,5 |
| Polimerase <i>Taq</i> do ADN (<i>Taq</i>) | 0,5 |
| Volume total | 20,0 |

* Ao preparar a mistura principal, prepare em quantidade suficiente para uma amostra suplementar.

3. Misture muito bem cada mistura principal, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo 10 vezes. Adicione imediatamente 20 µl de mistura principal a cada tubo de tira PCR (não fornecido).
4. Adicione imediatamente 5 µl de água isenta de nuclease (H₂O) aos tubos de tira PCR de controlo sem modelo (tubos de PCR números 9 a 16) e coloque a tampa nos tubos. Adicione 5 µl de cada amostra aos tubos de amostra (tubos de PCR 17 a 72) e coloque-lhes as tampas. Adicione 5 µl de Controlo Positivo (PC) EGFR aos tubos de controlo positivo (tubos de PCR 1 a 8). Cada amostra de ADN deve ser testada com todos os ensaios de mutação e de controlo. A configuração é apresentada no Quadro 4.

Quadro 4. Configuração dos ensaios de controlo e mutação

| Ensaio | Controlos | | Número de amostra | | | | | | |
|-----------|-----------|-----|-------------------|----|----|----|----|----|----|
| | PC | NTC | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Ctrl | 1 | 9 | 17 | 25 | 33 | 41 | 49 | 57 | 65 |
| T790M | 2 | 10 | 18 | 26 | 34 | 42 | 50 | 58 | 66 |
| Delecções | 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 |

- Coloque os tubos de tira PCR nas posições adequadas no rotor e certifique-se visualmente de que todos os tubos contêm um volume igual.

Nota: Certifique-se de que os tubos de tira não estão invertidos quando os transferir para o rotor.

- Se o rotor não ficar totalmente ocupado, preencha os espaços restantes com tubos vazios com tampa.
- Coloque imediatamente o rotor no equipamento Rotor-Gene Q 5plex HRM. Certifique-se de que o anel de aperto (acessório do equipamento Rotor-Gene Q) é colocado por cima do rotor para prender os tubos durante a execução.
- Consulte a configuração do equipamento Rotor-Gene Q (consulte "Protocolo: Configuração do Rotor-Gene Q EGFR", na página 21) para criar o perfil de temperatura e iniciar a execução.

Quadro 5. Parâmetros de ciclagem

| Ciclos | Temperatura | Tempo | Aquisição de dados |
|--------|-------------|-------------|--------------------|
| 1 | 95 °C | 15 minutos | Nenhum |
| 40 | 95 °C | 30 segundos | Nenhum |
| | 60 °C | 60 segundos | Verde e amarelo |

- Depois de terminada a execução, analise os dados de acordo com "Análise de dados de mutação EGFR", na página 34.

Protocolo: Configuração do Rotor-Gene Q EGFR

Este protocolo está referenciado em “Protocolo: Avaliação de amostras”, na página 15 e em “Protocolo: Detecção de mutações EGFR”, na página 18.

Procedimento

1. Crie um perfil de temperatura de acordo com os seguintes passos.

| | |
|---|----------------|
| Definição dos parâmetros gerais de ensaio | Figuras 1 a 3 |
| Activação inicial da enzima “Hot-Start” | Figura 4 |
| Amplificação do ADN | Figuras 5 a 7 |
| Ajuste dos canais de fluorescência | Figuras 8 a 12 |
| Iniciar a execução | Figura 13 |

Em resumo, os parâmetros de ciclagem são os seguintes.

Quadro 6. Parâmetros de ciclagem

| Ciclos | Temperatura | Tempo | Aquisição de dados |
|--------|-------------|-------------|--------------------|
| 1 | 95 °C | 15 minutos | Nenhum |
| 40 | 95 °C | 30 segundos | Nenhum |
| | 60 °C | 60 segundos | Verde e amarelo |

Todas as especificações referem-se à versão 2.0.2 do software do Rotor-Gene Q. Para mais informações sobre a programação dos equipamentos Rotor-Gene, consulte o manual de utilizador do equipamento. Nas ilustrações, estas definições têm uma moldura a negrito.

- 2. Faça duplo clique no ícone do software do Rotor-Gene Q, versão 2.0.2, no ambiente de trabalho do computador ligado ao equipamento Rotor-Gene Q 5plex HRM. Seleccione o separador “Advanced” (Avançadas) na caixa de diálogo “New Run” (Nova execução) que aparece.**
- 3. Para criar um novo modelo, seleccione “Empty Run” (Execução vazia) e, em seguida, clique em “New” (Novo) para entrar no “New Run Wizard” (Assistente de nova execução).**

4. Selecione o **72-Well Rotor** (rotor de 72 poços) como tipo de rotor. Confirme que o anel de aperto está anexado e marque a caixa **“Locking Ring Attached”** (Anel de aperto anexado). Clique em **“Next”** (Seguinte) (Figura 1).

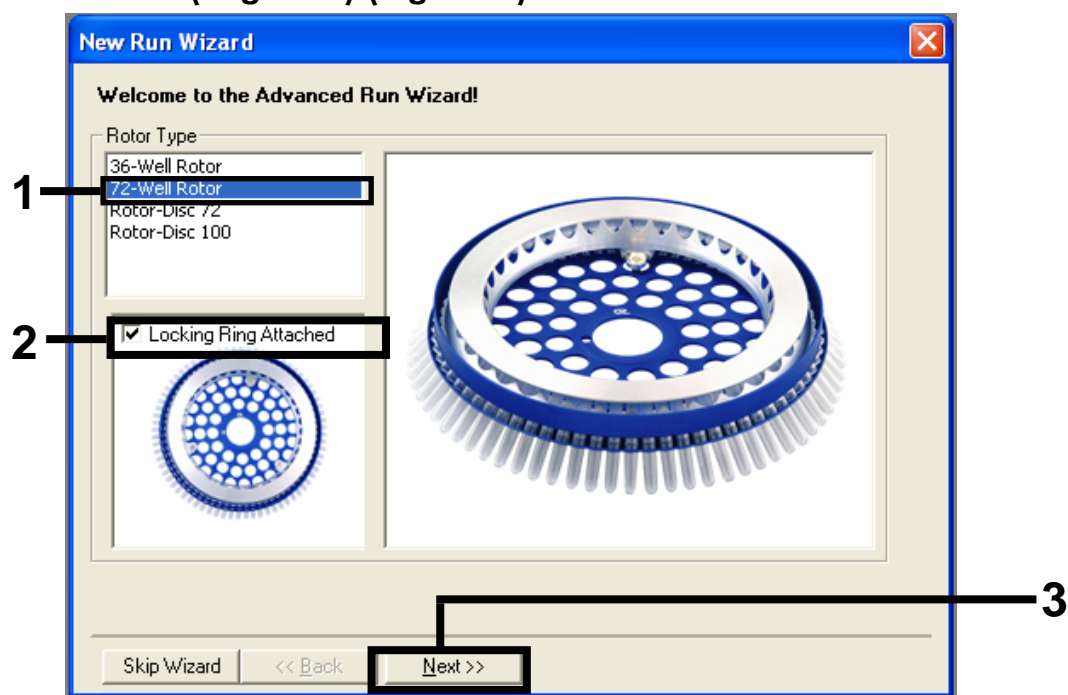


Figura 1. A caixa de diálogo “New Run Wizard” (Assistente de nova execução).

5. Introduza o nome do operador. Adicione as notas que desejar e introduza 25 no volume de reacção. Certifique-se de que **“Sample Layout”** indica **“1,2,3...”**. Clique em **“Next”** (Seguinte) (Figura 2).

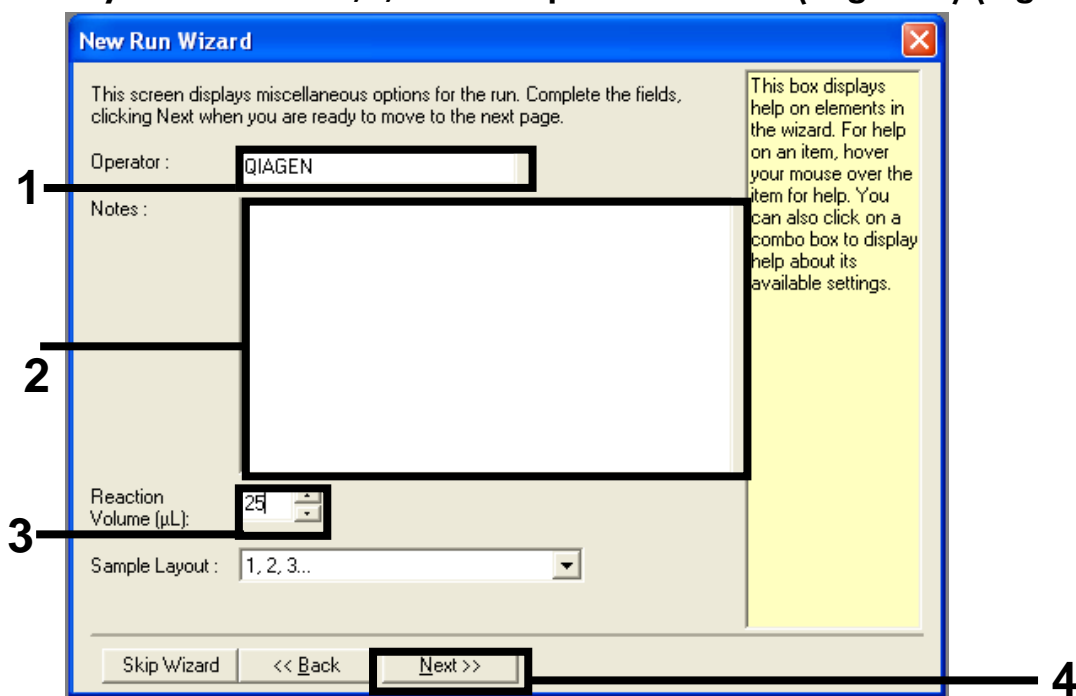


Figura 2. Definição dos parâmetros gerais de ensaio.

6. Clique no botão “Edit Profile” (Editar perfil) na caixa de diálogo “New Run Wizard” (Assistente de nova execução) seguinte (Figura 3) e programe o perfil de temperatura de acordo com as informações nos passos apresentados a seguir.



Figura 3. Edição do perfil.

7. Clique no botão “Insert after” e selecione *New Hold at Temperature* (Figura 4).

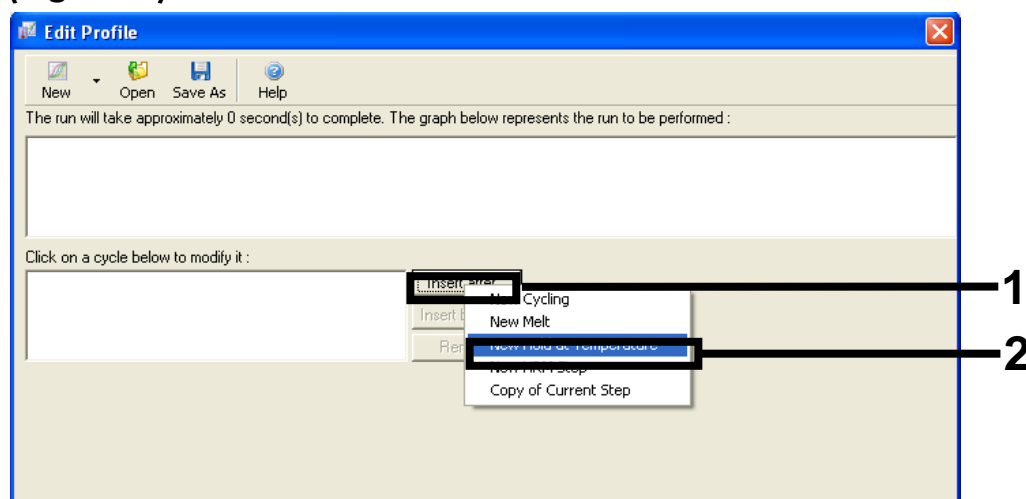


Figura 4. Passo inicial de incubação a 95 °C.

8. Altere a “Hold Temperature” para 95 °C e o “Hold Time” para 15 mins. Clique no botão “Insert After” e selecione *New Cycling* (Figura 5).

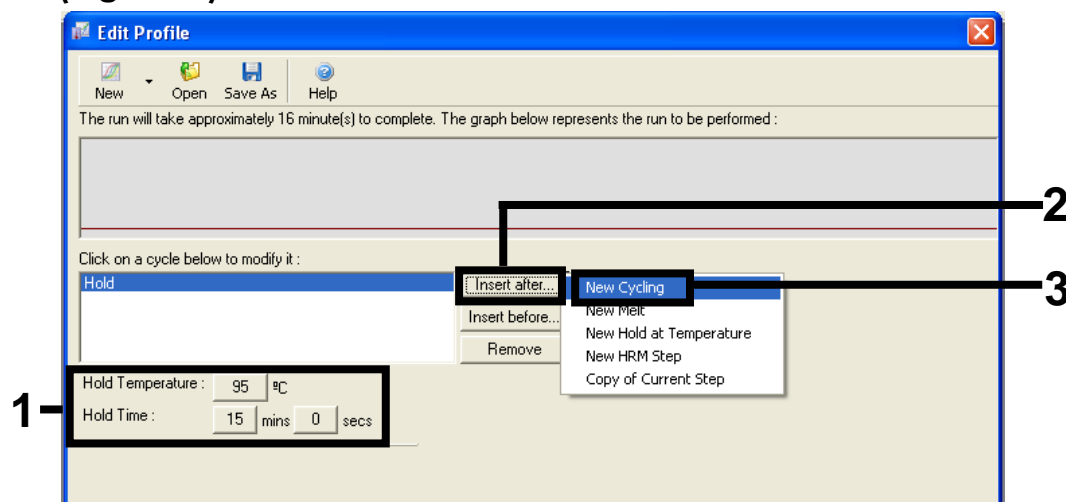


Figura 5. Passo inicial de incubação a 95 °C.

9. Altere o número de repetições de ciclo para 40. Selecione o primeiro passo e defina para 95°C for 30 secs (Figura 6).

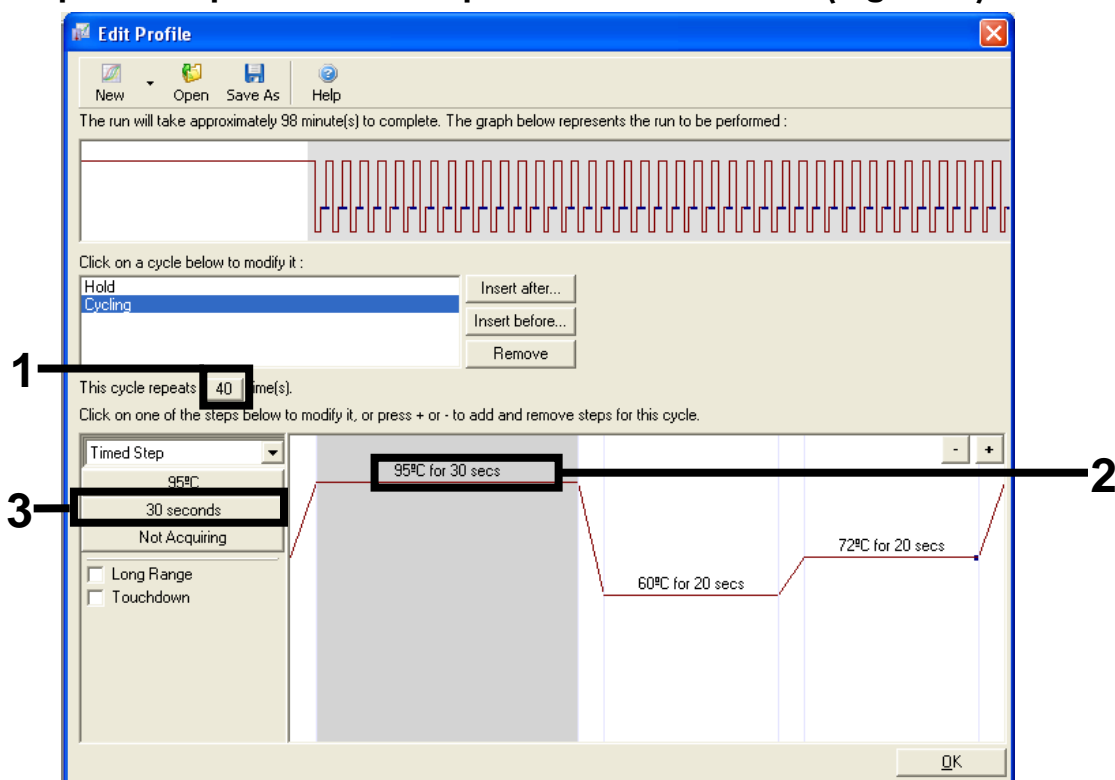


Figura 6. Passo de ciclagem a 95 °C.

10. Coloque em destaque o segundo passo e defina para 60°C for 60 secs. Active a aquisição de dados durante este passo, seleccionando o botão “Not Acquiring” (Figura 7).

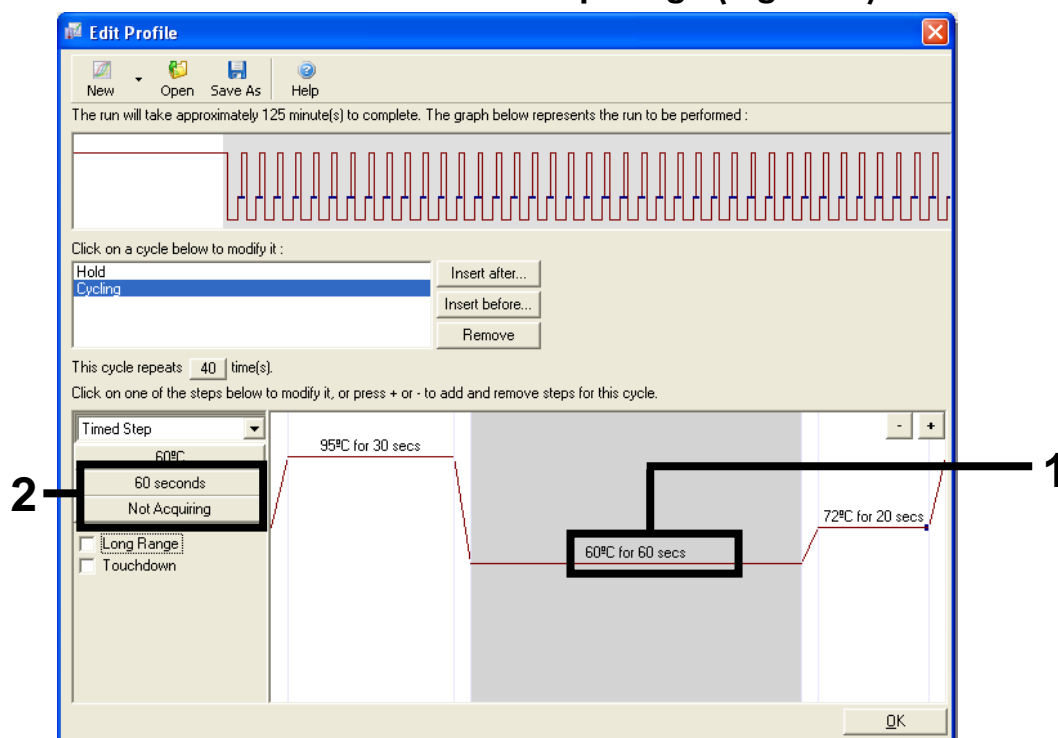


Figura 7. Passo de ciclagem a 60 °C.

11. Defina Green e Yellow como os canais de aquisição, seleccionando o botão “>” para os transferir da lista de canais disponíveis “Available Channels”. Clique em “OK” (Figura 8).

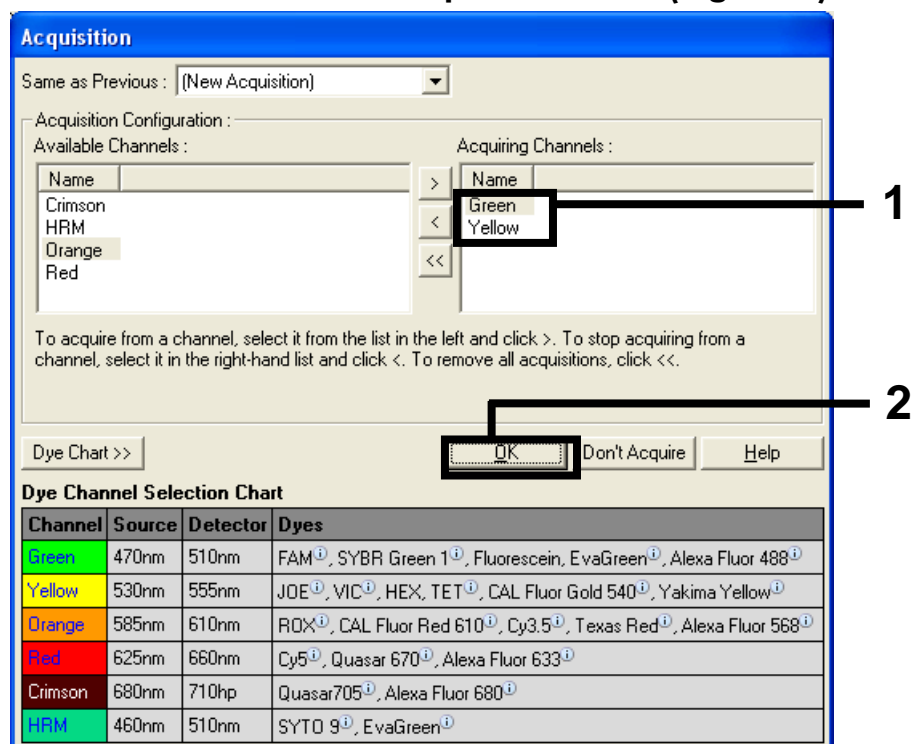


Figura 8. Aquisição de dados no passo de ciclagem de 60 °C.

12. Coloque em destaque o terceiro passo e elimine clicando o botão "-". Clique em "OK" (Figura 9).

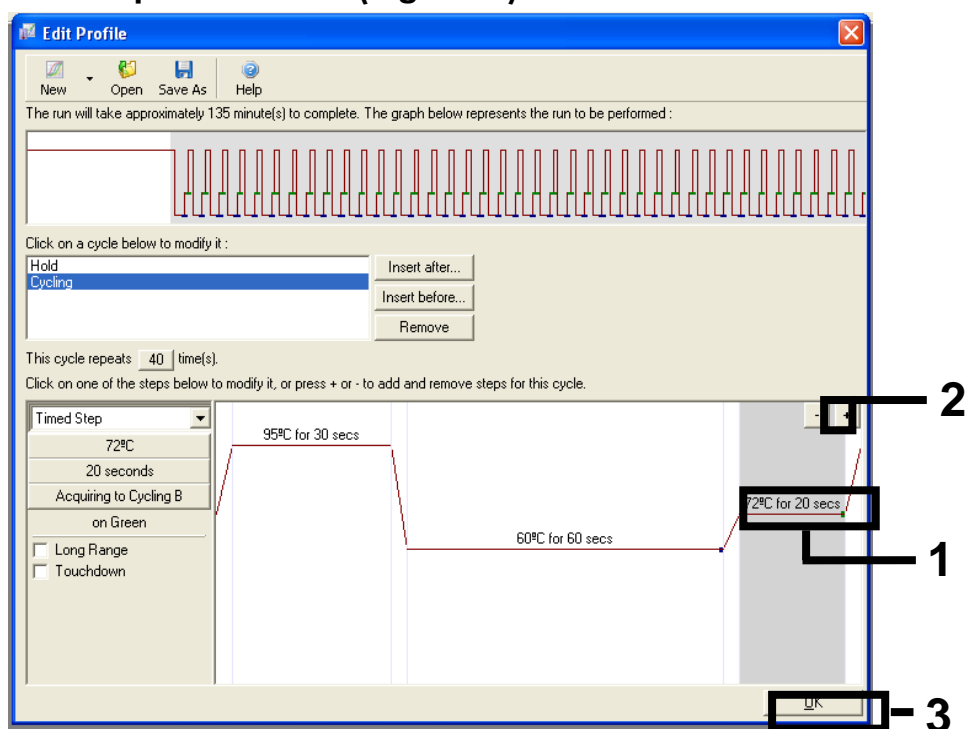


Figura 9. Remoção do passo de extensão.

13. Na caixa de diálogo seguinte, clique no botão "Gain Optimisation" (Figura 10).

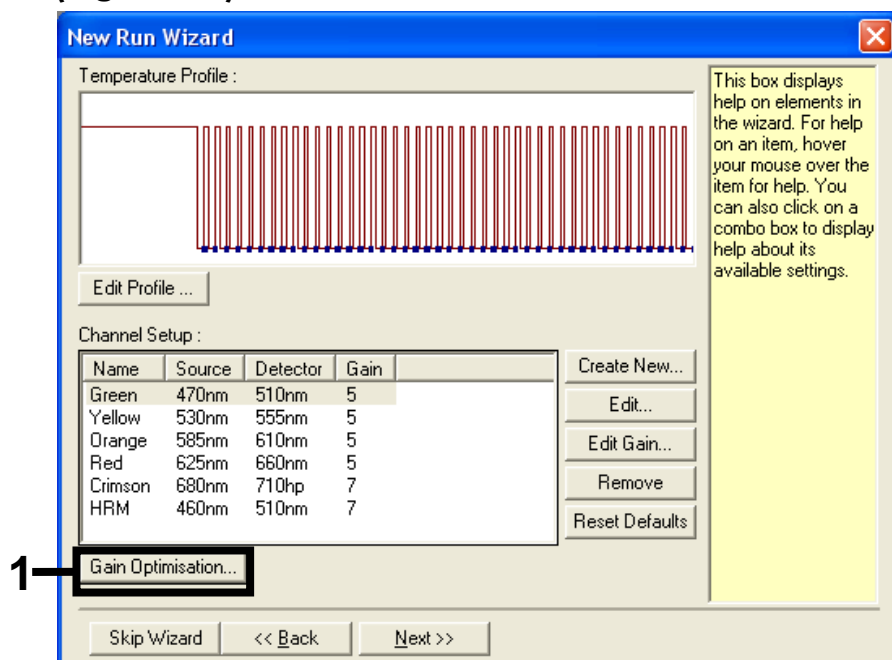


Figura 10. Otimização de aquisição de dados.

14. Clique no botão “Optimise Acquiring”. Aparecem então as definições de cada canal. Aceite estes valores predefinidos, clicando “OK” para ambos os canais (Figura 11).

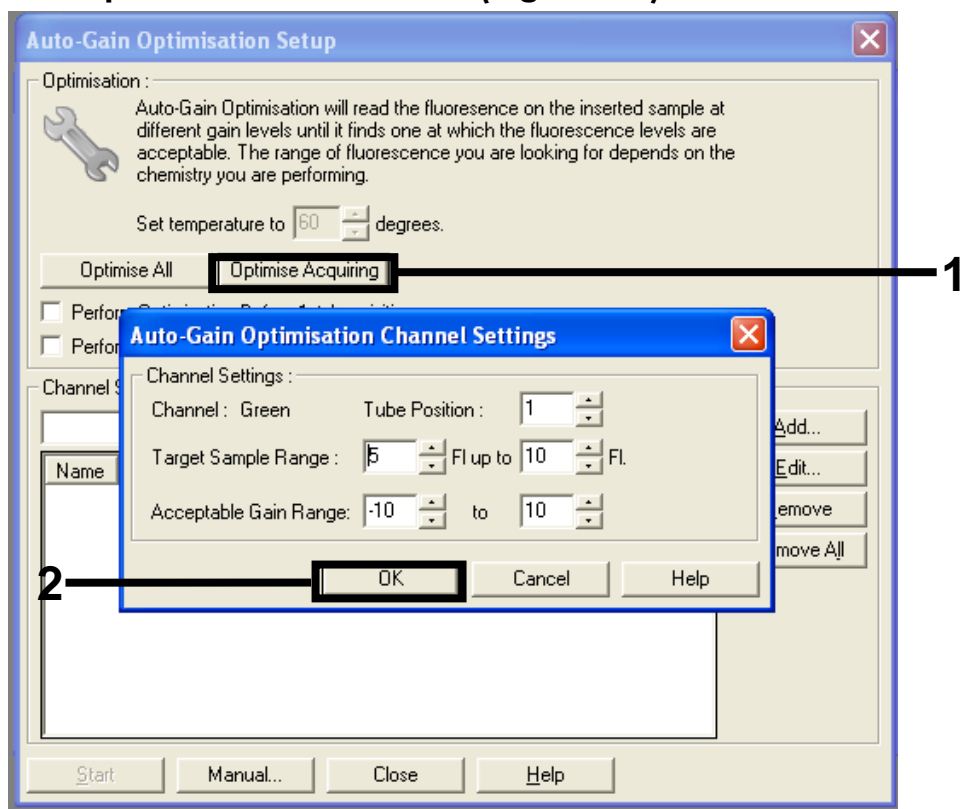


Figura 11. Optimização de auto-aquisição de dados para o canal verde.

15. Marque a caixa “Perform Optimisation before 1st Acquisition” (Efectuar optimização antes da 1ª aquisição) e, em seguida, clique no botão “Close” (Fechar) para voltar ao assistente (Figura 12).

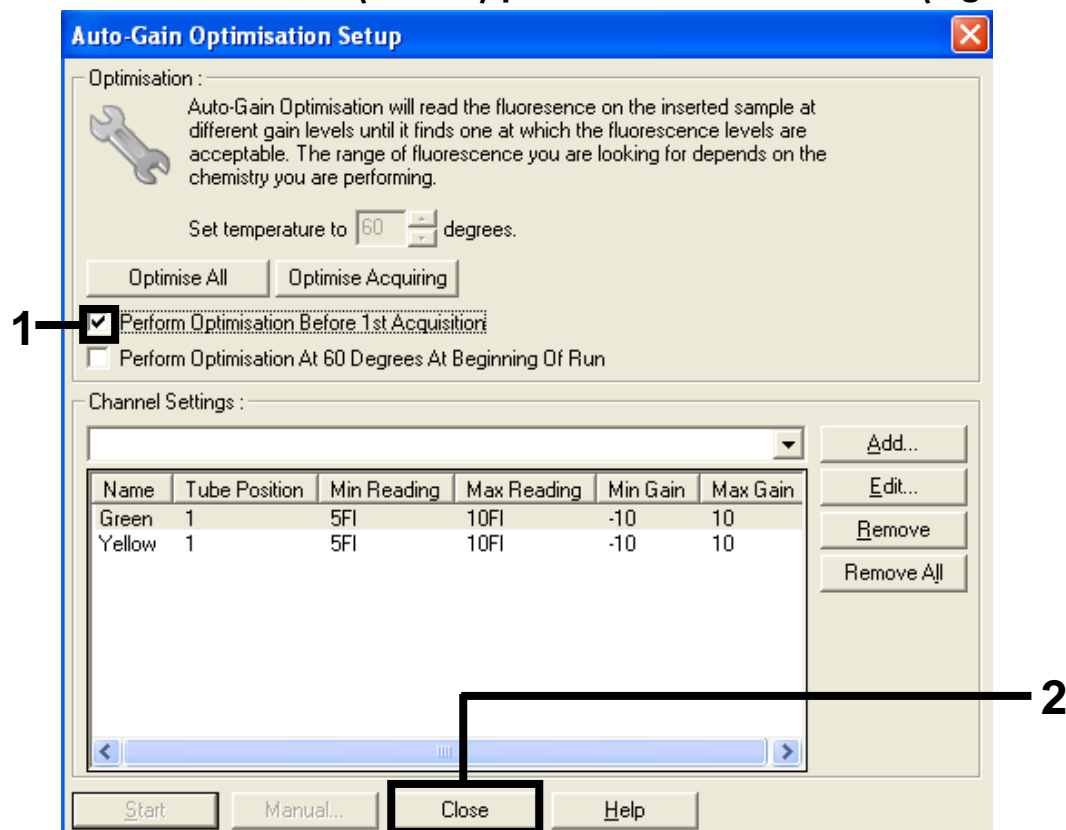


Figura 12. Selecção dos canais verde e amarelo.

16. Clique em “Next” (Seguinte) e seleccione “Save Template” (Guardar modelo) para guardar o modelo num local apropriado.

17. Confira o resumo e clique em “Start Run” (Iniciar execução) para guardar o ficheiro de execução e iniciar a execução (Figura 13).

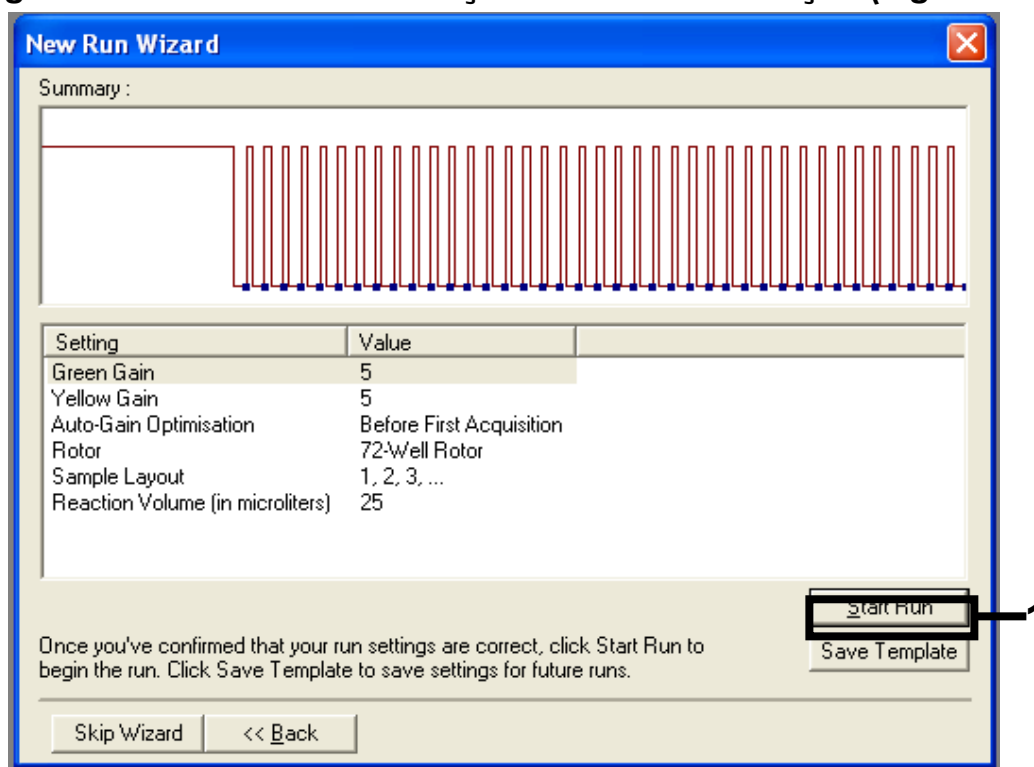


Figura 13. Iniciar a execução.

18. Após o início da execução, aparece uma nova janela na qual pode introduzir logo os nomes das amostras, ou pode clicar em “Finish” e introduzi-los mais tarde seleccionando o botão “Sample” durante a execução ou quando a execução estiver concluída.
19. Depois de concluída a execução, analise os dados de acordo com o protocolo adequado:
- Para a avaliação de amostras, consulte “Análise de dados de avaliação de amostras”, na página 30.
 - Para a análise da mutação, consulte “Análise de dados de mutação EGFR”, na página 34.

Interpretação de resultados

Método de análise ΔC_T

Os ensaios de Scorpions em tempo real utilizam o número de ciclos de PCRs necessários para detectar um sinal fluorescente acima de um sinal de fundo, como uma determinação das moléculas-alvo presentes no início da reacção. O ponto no qual o sinal é detectado acima da fluorescência do fundo é denominado o limiar do ciclo (C_T).

Os valores ΔC_T da amostra são calculados como a diferença entre o C_T do ensaio de mutação e o C_T do ensaio de controlo da mesma amostra:

$$\Delta C_T = C_T \text{ da mutação} - C_T \text{ do controlo}$$

Nota: As amostras são classificadas como tendo mutação positiva se tiverem valores de ΔC_T inferiores ao valor ΔC_T de cut-off desse ensaio. Acima desse valor, a amostra poderá conter menos do que a percentagem de mutação capaz de ser detectada pelo kit (para além do limite dos ensaios), ou a amostra poderá ser negativa quanto a mutação.

Nota: Os valores C_T de mutação de 40 ou superior serão classificados como negativos ou para além dos limites do kit.

Quando se utilizam iniciadores ARMS, pode ocorrer alguma iniciação ineficaz, originando um C_T de fundo muito retardado, de ADN que não contém uma mutação. Todos os valores ΔC_T calculados a partir da amplificação de fundo serão superiores aos valores ΔC_T de cut-off e a amostra será classificada como negativa quanto a mutação.

Análise de dados de avaliação de amostras

Depois de concluída a execução, analise os dados de acordo com o seguinte procedimento.

Definições de análise do software

1. Abra o ficheiro apropriado, utilizando o software Rotor-Gene Q, versão série 2.0.2 ou superior.
2. Certifique-se de que as amostras estão etiquetadas.
3. Quando estiver na página que mostra os dados não específicos de cada detector/canal, clique em "Options" (Opções) e introduza *Crop start cycles* (Eliminar ciclos de início). Na página com "Remove data before cycle" (Eliminar dados antes do ciclo), introduza 15 e clique em "OK".
4. Clique em "Analyse" (Análise). Na página de análise, clique em "Cycling A (from 15), Yellow" (Ciclagem A (desde 15), Amarelo) para verificar o canal HEX.

5. **Certifique-se de que “dynamic tube” (tubo dinâmico) está em destaque. Clique em “Slope correct” (Declive correcto) e “Linear scale” (Escala linear).**
6. **Defina o limiar em 0,02 e verifique os valores de C_T de HEX.**
7. **Na página de análise, clique em “Cycling A (from 15), Green” (Ciclagem A (desde 15), Verde) para visualizar o canal FAM.**
8. **O tubo dinâmico deve estar em destaque. Clique em “Slope correct” (Declive correcto) e “Linear scale” (Escala linear).**
9. **Defina o limiar em 0,075 e verifique os valores de C_T de FAM.**

Depois de concluída a execução, analise os dados conforme se segue.

- **Controlo negativo:** Para garantir que não existe contaminação de modelo, o controlo sem modelo (NTC) não deve gerar um valor C_T no canal verde (FAM) abaixo de 40. Consulte “Notas de interpretação de dados” na página 40 para informações importantes sobre a análise de traçados gráficos de controlos sem modelo (NTC). Para garantir que a execução foi configurada correctamente, o controlo sem modelo (NTC) deve apresentar uma amplificação entre 31 e 37 no canal amarelo (HEX).

Se houver amplificação positiva no canal verde e/ou amplificação fora do intervalo 31 a 37 no sinal amarelo, os resultados da amostra devem ser eliminados.
- **Controlo positivo:** O controlo positivo (PC) EGFR tem de apresentar um C_T de ensaio de controlo (canal FAM) entre 26,26 e 30,95. Um ensaio com um valor C_T fora deste intervalo indica um problema de configuração do ensaio e a execução deve ser considerada como falhada. Se o C_T do ensaio de controlo positivo se encontrar entre 26,26 e 30,95 (exão 2, FAM), mas o C_T (HEX) do controlo interno se encontrar fora de intervalo 31 a 37, continue com a análise.

Nota: Os dados de amostra não deverão ser utilizados se qualquer um destes dois controlos de execução falhar.

Desde que ambos os controlos de execução sejam válidos, o valor C_T de cada amostra deverá encontrar-se dentro do intervalo de 23 a 30,69 no canal verde (FAM). Se a amostra estiver fora deste intervalo, é fornecido o seguinte guia.

- **C_T do ensaio de controlo de amostras < 23:** As amostras com um C_T de controlo < 23 irão sobrecarregar os ensaios de mutação e devem ser diluídas. Para detectar cada mutação a um nível baixo, as amostras sobreconcentradas devem ser diluídas para ficarem dentro do intervalo indicado acima, utilizando o princípio de que diluindo para metade aumentará o C_T em 1.

- **C_T do ensaio de controlo de amostras de 30,69-37:** Interprete com cuidado, uma vez que mutações de nível muito baixo poderão não ser detectadas.
- **C_T do ensaio de controlo de amostras de 37-40:** Interprete com cuidado, uma vez que apenas as mutações de nível muito elevado serão detectadas.
- **C_T do ensaio de controlo de amostras > 40:** A amostra não contém ADN suficiente para permitir uma análise.

Nota: Se uma amostra não gerar um C_T (ou seja, $C_T > 40$), poderá ser devido à presença de um inibidor, um erro na configuração do ensaio ou não existe ADN de EGFR amplificável.

- **Valor de C_T do controlo interno de 31 a 37:** Não existe ADN de EGFR amplificável.
- **Valor de C_T do controlo interno não está dentro do intervalo de 31 a 37:** Isto poderá indicar um erro de configuração do ensaio ou a presença de um inibidor. É possível reduzir o efeito de um inibidor diluindo a amostra, embora isto também dilua o ADN.

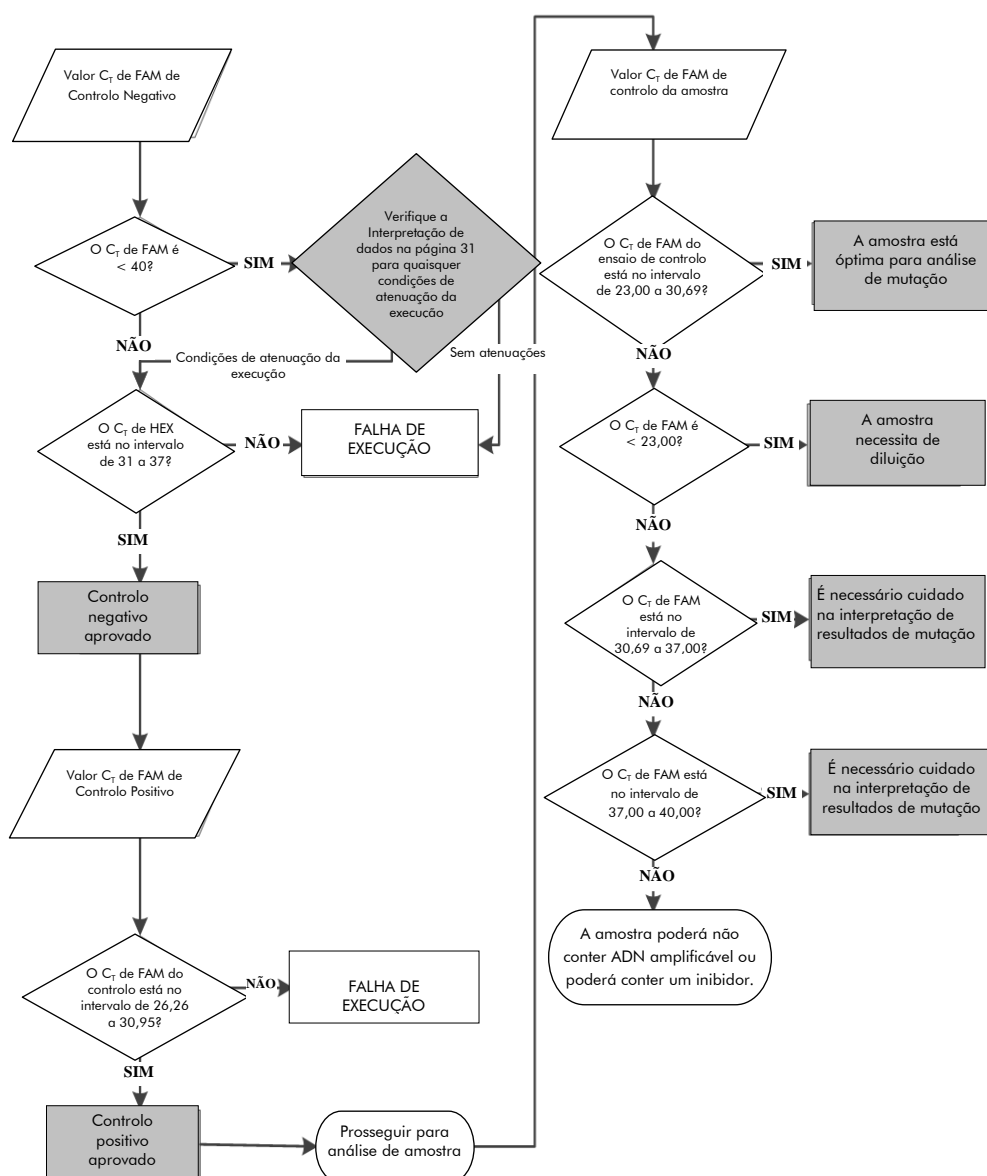


Figura 14. Fluxo de trabalho da análise de avaliação de amostras.

Análise de dados de mutação EGFR

Depois de concluída a execução, analise os dados de acordo com o seguinte procedimento.

Definições de análise do software

1. Abra o ficheiro apropriado, utilizando o software Rotor-Gene Q, versão série 2.0.2 ou superior.
2. Certifique-se de que as amostras estão etiquetadas.
3. Quando estiver na página que mostra os dados não específicos de cada detector/canal, clique em "Options" (Opções) e introduza *Crop start cycles* (Eliminar ciclos de início). Na página com "Remove data before cycle" (Eliminar dados antes do ciclo), introduza 15 e clique em "OK".
4. Clique em "Analyse" (Análise). Na página de análise, clique em "Cycling A (from 15), Yellow" (Ciclagem A (desde 15), Amarelo) para visualizar o canal HEX.
5. Certifique-se de que "dynamic tube" (tubo dinâmico) está em destaque. Clique em "Slope correct" (Declive correcto) e "Linear scale" (Escala linear).
6. Defina o limiar em 0,02 e verifique os valores de C_T de HEX.
7. Na página de análise, clique em "Cycling A (from 15), Green" (Ciclagem A (desde 15), Verde) para visualizar o canal FAM.
8. Certifique-se de que "dynamic tube" (tubo dinâmico) está em destaque. Clique em "Slope correct" (Declive correcto) e "Linear scale" (Escala linear).
9. Defina o limiar em 0,075 e verifique os valores de C_T de FAM.

Executar análise de controlo:

Consulte o diagrama "Execução de análise de controlo" na Figura 15.

- **Controlo negativo:** Para garantir que não existe contaminação de modelo, o controlo sem modelo (NTC) não deve gerar um valor C_T no canal verde (FAM) abaixo de 40. Consulte "Notas de interpretação de dados" na página 40 para informações importantes sobre a análise de traçados gráficos de controlos sem modelo (NTC). Para garantir que a execução foi configurada correctamente, o controlo sem modelo (NTC) deve apresentar uma amplificação do C_T de 31 a 37 no canal amarelo (HEX).

Se houver amplificação positiva no canal verde e/ou amplificação fora do intervalo 31 a 37 no sinal amarelo, os resultados da amostra devem ser eliminados.

- **Controlo positivo:** O controlo positivo (PC) EGFR tem de apresentar um C_T de ensaio de controlo entre 26,26 e 30,95 no canal verde. Um ensaio com um valor C_T fora deste intervalo indica um problema de configuração do ensaio e a execução deve ser considerada como falhada. Se o C_T do ensaio de controlo positivo se encontrar entre 26,26 e 30,95 (exão 2, FAM), mas o C_T (HEX) do controlo interno se encontrar fora de intervalo 31 a 37, continue com a análise.

Calcule conforme se segue o valor ΔC_T de cada ensaio de mutação, certificando-se de que os valores C_T de mutação e de controlo são do controlo positivo.

$$\Delta C_T = C_T \text{ da mutação} - C_T \text{ do controlo}$$

Os valores ΔC_T do controlo positivo (PC) EGFR devem ficar dentro dos valores indicados no Quadro 7.

Quadro 7. Valores ΔC_T previstos para o controlo positivo*

| Ensaio | Valor ΔC_T do controlo positivo |
|-----------|---|
| T790M | - 2,88 a 3,01 |
| Delecções | - 6,71 a 4,16 |
| L858R | - 2,41 a 0,90 |
| L861Q | - 4,61 a 1,48 |
| G719X | - 2,89 a 1,03 |
| S768I | - 3,37 a 2,31 |
| Inserções | - 2,93 a 1,28 |

* Software Rotor-Gene Q (2.0.2)

Nota: Os dados de amostra não deverão ser utilizados se qualquer um dos controlos de execução (negativo ou positivo) falhar.

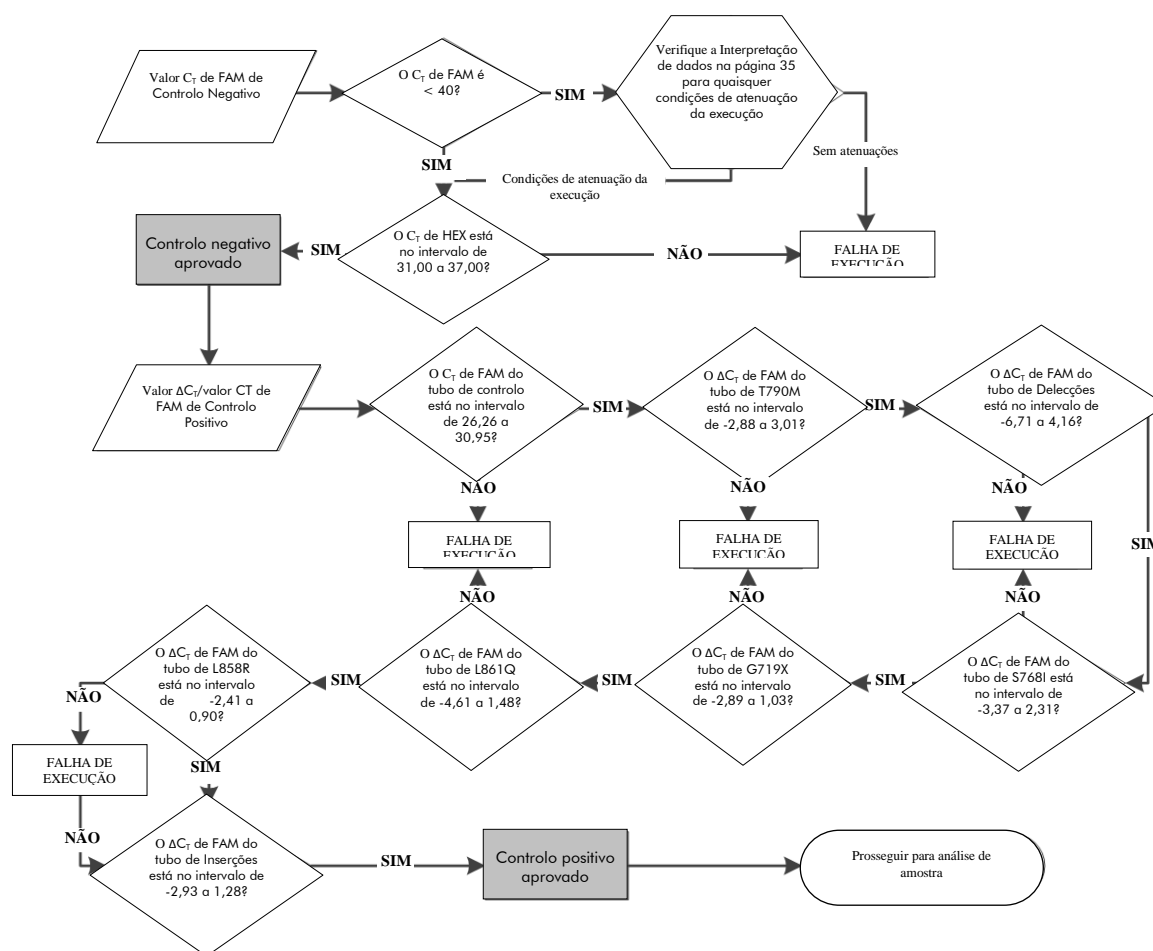


Figura 15. Fluxo de trabalho de execução de análise de controlo.

Análise de amostras:

Valor C_T de FAM de controlo da amostra

Desde que ambos os controlos de execução sejam válidos, o valor C_T de cada controlo da amostra deverá encontrar-se dentro do intervalo de 23 a 30,69 no canal verde. Consulte o diagrama “Análise da amostra” na Figura 16.

- **C_T do ensaio de controlo de amostras < 23:** As amostras com um C_T de controlo < 23 irão sobrecarregar os ensaios de mutação e devem ser diluídas. Para detectar cada mutação a um nível baixo, as amostras sobreconcentradas devem ser diluídas para ficarem dentro do intervalo indicado acima, utilizando o princípio de que diluindo para metade aumentará o C_T em 1.
- **C_T do ensaio de controlo de amostras no intervalo de 30,69 a 37:** Interprete com cuidado, uma vez que mutações de nível muito baixo poderão não ser detectadas.

- **C_T do ensaio de controlo de amostras no intervalo de 37 a 40:**
Interprete com cuidado, uma vez que apenas as mutações de nível muito elevado serão detectadas.
- **C_T do ensaio de controlo de amostras > 40:** A amostra não contém ADN suficiente para permitir uma análise.

Nota: Se o valor C_T de FAM da amostra se encontrar entre 23 e < 37, não há necessidade de avaliar o controlo interno.

Nota: Se uma amostra não gerar um C_T (ou seja, C_T > 40), poderá ser devido à presença de um inibidor, um erro na configuração do ensaio ou não existe ADN de EGFR amplificável.

- **Valor de C_T do controlo interno de 31 a 37:** O ensaio está a funcionar correctamente, mas não existe ADN de EGFR amplificável.
- **Valor de C_T do controlo interno não está dentro do intervalo de 31 a 37:** Isto poderá indicar um erro de configuração do ensaio ou a presença de um inibidor. É possível reduzir o efeito de um inibidor diluindo a amostra, embora isto também dilua o ADN.

Nota: Se a reacção FAM do ensaio de mutação não gerar um valor C_T e as reacções do controlo interno gerarem um valor C_T fora do intervalo de 31 a 37, os dados devem ser eliminados, pois poderão estar presentes inibidores que poderiam originar resultados falsos-negativos. A diluição da amostra pode reduzir o efeito dos inibidores, mas tenha em atenção que a mesma também diluiria o ADN.

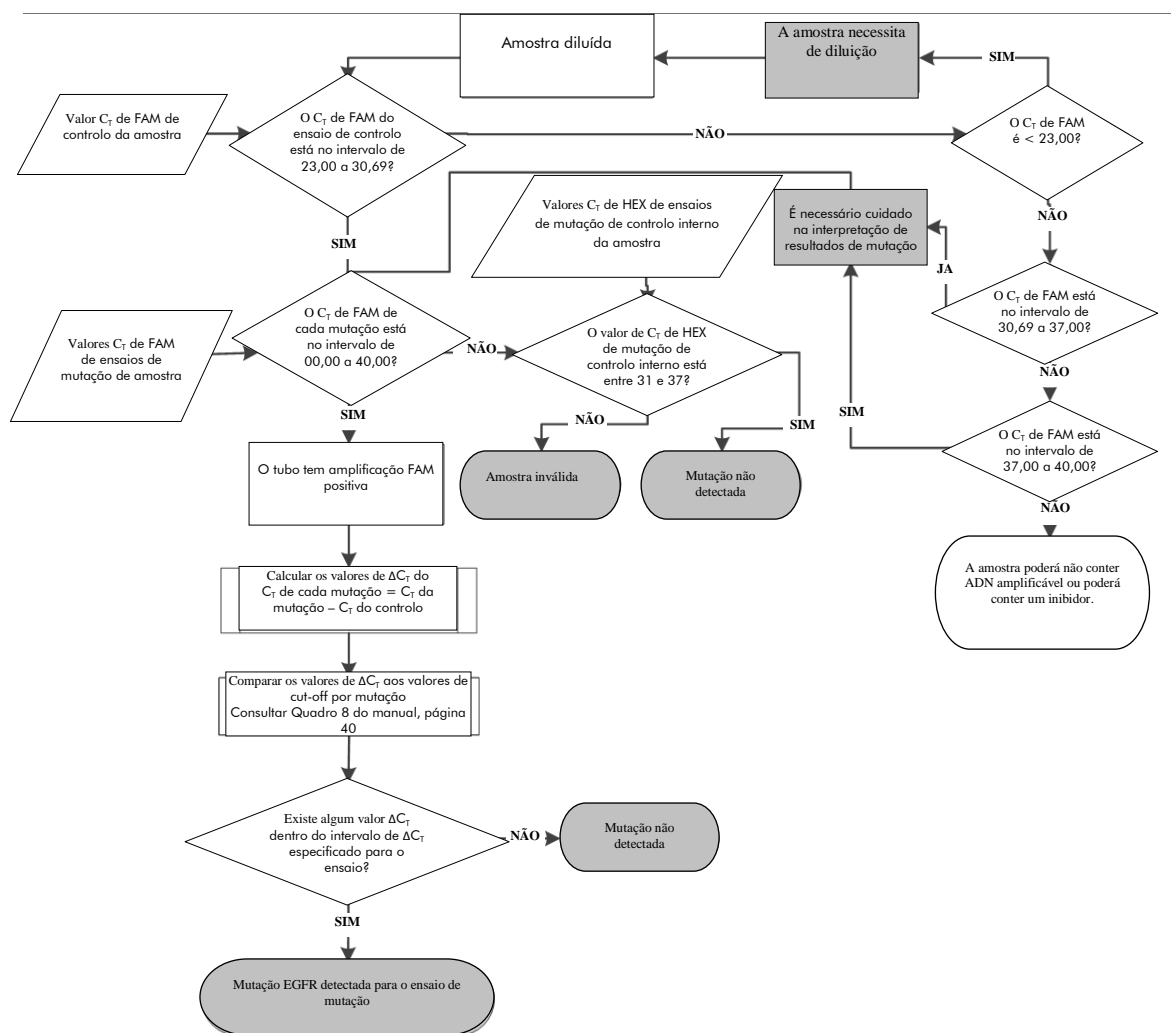


Figura 16. Diagrama de análise de mutação.

Valor C_T de FAM de ensaios de mutação de amostra

Os valores FAM de todas as sete misturas de reacção de mutação deverão ser comparados aos valores apresentados no Quadro 8.

Quadro 8. Valores aceitáveis de reacção de mutação de amostra (FAM)*

| Ensaio | Intervalo C_T aceitável | Valor ΔC_T de cut-off |
|-----------|---------------------------|-------------------------------|
| T790M | 15,00–40,00 | 6,38 |
| Delecções | 15,00–40,00 | 9,06 |
| L858R | 15,00–40,00 | 8,58 |
| L861Q | 15,00–40,00 | 9,26 |
| G719X | 15,00–40,00 | 9,31 |
| S768I | 15,00–40,00 | 9,26 |
| Inserções | 15,00–40,00 | 7,91 |

* Os valores aceitáveis estão dentro e incluem os valores apresentados.

- Se o C_T do FAM ficar dentro do intervalo especificado de 15,00 a 40,00, é observada amplificação FAM positiva.
- Se o C_T do FAM ficar acima do intervalo especificado ou não ocorrer amplificação, é observada amplificação FAM negativa.

Calcule conforme se segue o valor ΔC_T de cada amostra de mutação que apresente amplificação positiva, certificando-se de que os valores C_T de mutação e de controlo são da mesma amostra.

$$\Delta C_T = C_T \text{ da mutação} - C_T \text{ do controlo}$$

Compare o valor ΔC_T da amostra com o ponto de cut-off do ensaio em questão (Quadro 8), certificando-se de que o ponto de cut-off correcto é aplicado a cada ensaio.

O ponto de cut-off é o ponto acima do qual poderá potencialmente estar um sinal positivo devido a um sinal de fundo do iniciador ARMS no ADN de tipo selvagem. Se o valor ΔC_T da amostra for superior ao ponto de cut-off, é classificado como “mutation not detected” (mutação não detectada) ou para além dos limites de detecção do kit. Se o valor da amostra for inferior ao ponto de cut-off, a amostra é considerada positiva para uma mutação detectada por esse ensaio.

Nota: Para as amostras que não apresentam C_T de mutação FAM, é necessária uma avaliação do C_T (HEX) do controlo interno para determinar se a mutação não é detectada ou se o ensaio é inválido. Se o valor do C_T HEX se encontrar entre 31 e 37, nesse caso a mutação não é detectada. Se o valor do C_T HEX se encontrar fora do intervalo de 31 a 37, nesse caso a amostra é inválida.

Em resumo, para cada amostra, será atribuído a cada reacção de mutação um estado de mutação detectada, de mutação não detectada ou de inválido, utilizando os critérios indicados a seguir.

- **Mutação detectada:** A amplificação FAM positiva e o ΔC_T são iguais ou inferiores ao valor de cut-off. Se forem detectadas várias mutações, podem ser reportadas todas.
- **Mutação não detectada:**
A amplificação FAM positiva e o ΔC_T são superiores ao valor de cut-off.
Amplificação FAM negativa e amplificação HEX (controlo interno) positiva.
- **Inválido:**
Amplificação FAM negativa e amplificação HEX fora das especificações.

Notas de interpretação de dados

Amplificação linear

Os traçados gráficos do Rotor-Gene Q de todas as reacções devem ser verificados. Por vezes, detecta-se um aumento no sinal de fluorescência no controlo sem modelo (NTC) e nas amostras negativas. Se for este o caso, e se for obtido um valor C_T , é necessário que o utilizador distinga entre um evento de amplificação real, que poderá indicar que há contaminação no NTC, e um aumento linear da fluorescência, que poderá ter aumentado devido a um artefacto de fluorescência.

Análise do NTC

As figuras 17 e 18 apresentam dois exemplos do comportamento de amostras de NTCs. Na Figura 17, é observado um comportamento não linear (amplificação real) devido a contaminação de amostra. Esta execução deve ser eliminada e as amostras devem ser testadas de novo. Na Figura 18, é

observada uma amplificação linear num NTC. Nestas circunstâncias, os dados não específicos da fluorescência devem ser examinados. O traçado gráfico correspondente dos dados não específicos da fluorescência está apresentado na Figura 19, indicando um aumento linear na fluorescência, em vez de um evento de amplificação real. Os dados desta execução podem ser utilizados, desde que os controlos positivos e internos tenham passado. Para a comparação com a Figura 19, a Figura 20 apresenta os dados não específicos da fluorescência onde ocorreu amplificação real. Nestas circunstâncias, os dados devem ser eliminados e as amostras novamente testadas, pois isto indica a presença de contaminação.

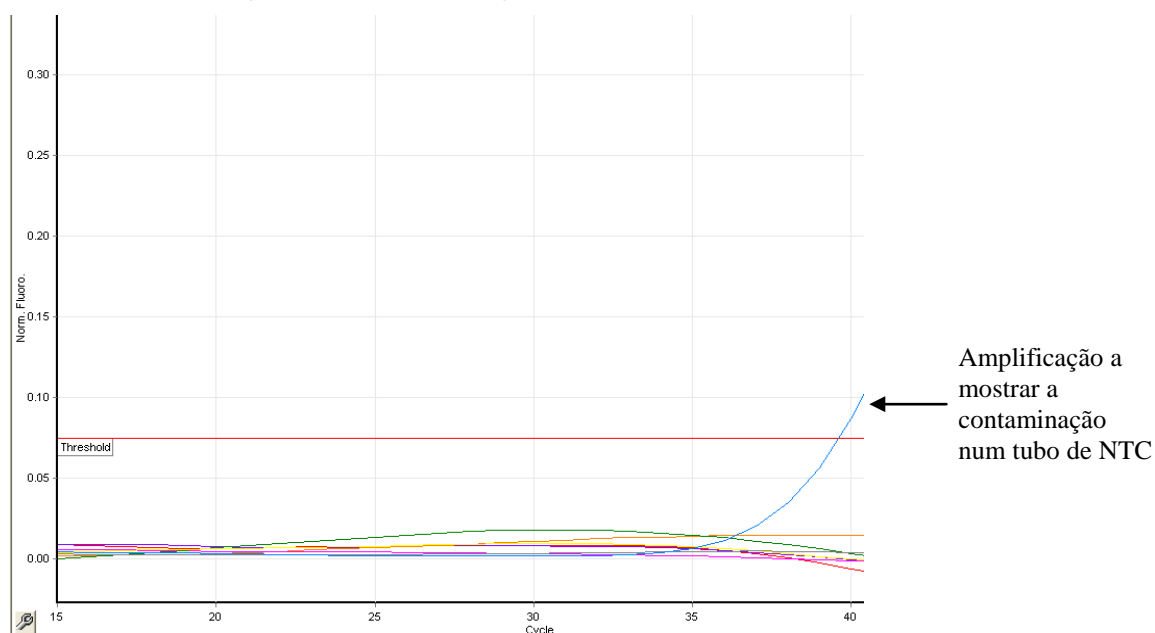


Figura 17. Contaminação num NTC de um ensaio numa execução analisada.

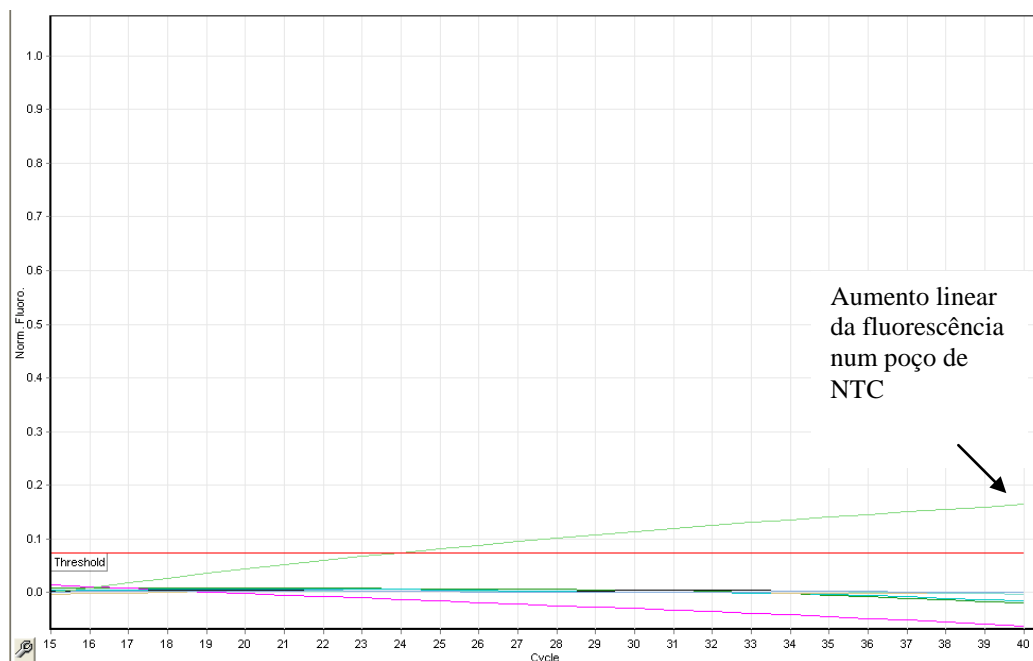


Figura 18. Exemplo de um aumento linear da fluorescência num poço de NTC.

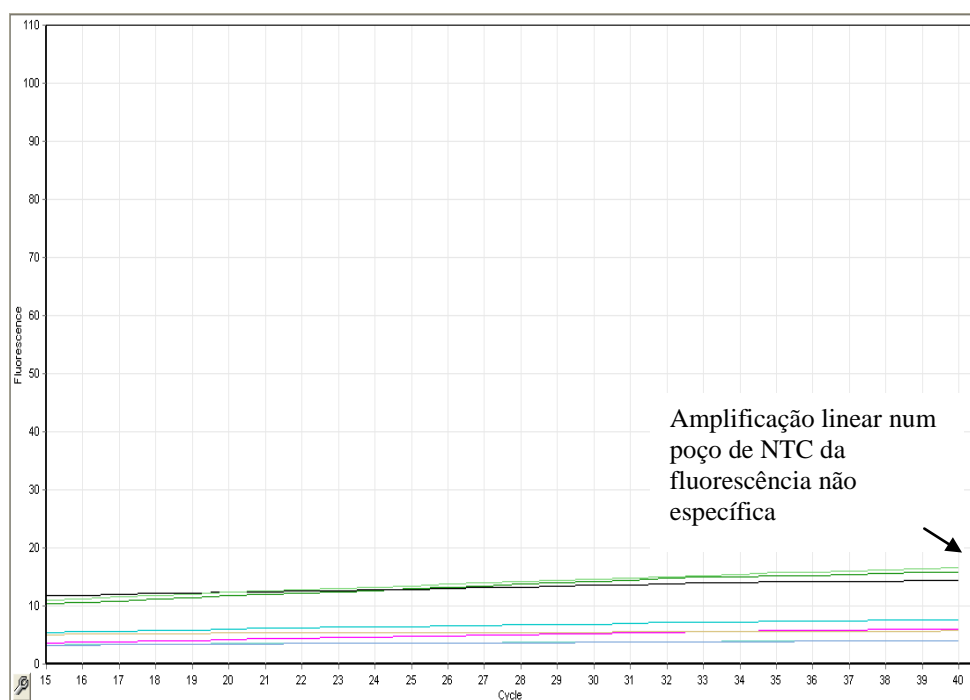


Figura 19. Fluorescência não específica da Figura 18.

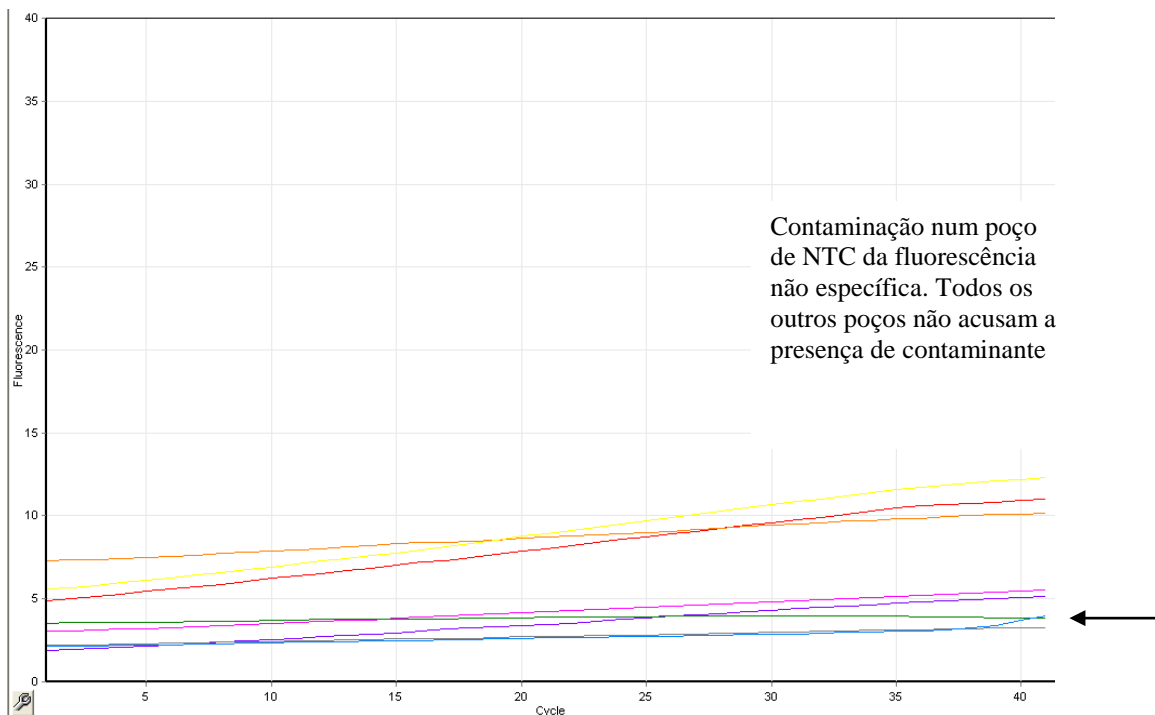


Figura 20. Dados não específicos da fluorescência, apresentando um poço de NTC com um evento de amplificação real.

Análise de amostras

As figuras 21 e 22 apresentam dois exemplos de amplificação em reacções de amostras. Na Figura 21, vê-se um exemplo de amplificação real num poço de amostra numa execução analisada. Se uma execução apresentar este tipo de curva de amplificação sigmoidal, trata-se de uma amplificação real e os dados desta execução podem ser utilizados, desde que os controlos positivos e internos tenham passado.

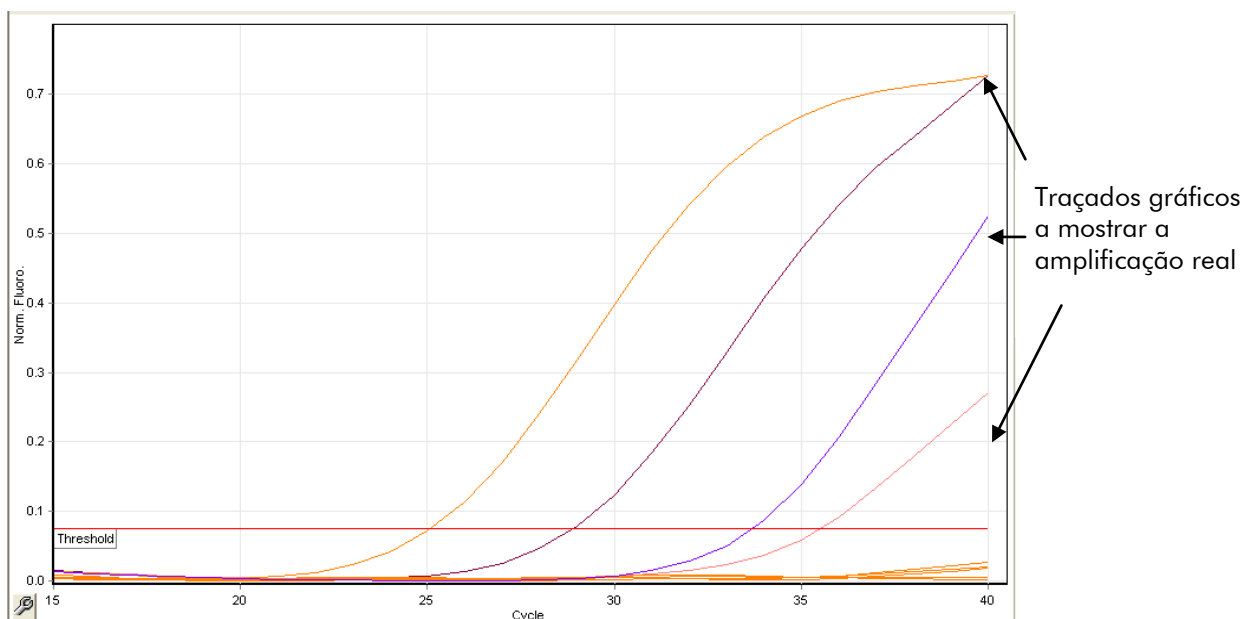


Figura 21. Amplificação real num poço de amostra de uma execução analisada.

Na Figura 22 vê-se um exemplo de amplificação linear numa reacção de amostra. Nestas circunstâncias, os dados não específicos da fluorescência devem ser examinados. O traçado gráfico correspondente dos dados não específicos da fluorescência (Figura 23) indica que o aumento linear observado na Figura 22 corresponde a um aumento linear dos dados não específicos da fluorescência e não a uma amplificação real. Desde que as verificações de controlo positivo e interno tenham passado, os resultados de amostra destas execuções podem ser utilizados com cuidado, de maneira que a amplificação linear é designada como “sem C_T ”.

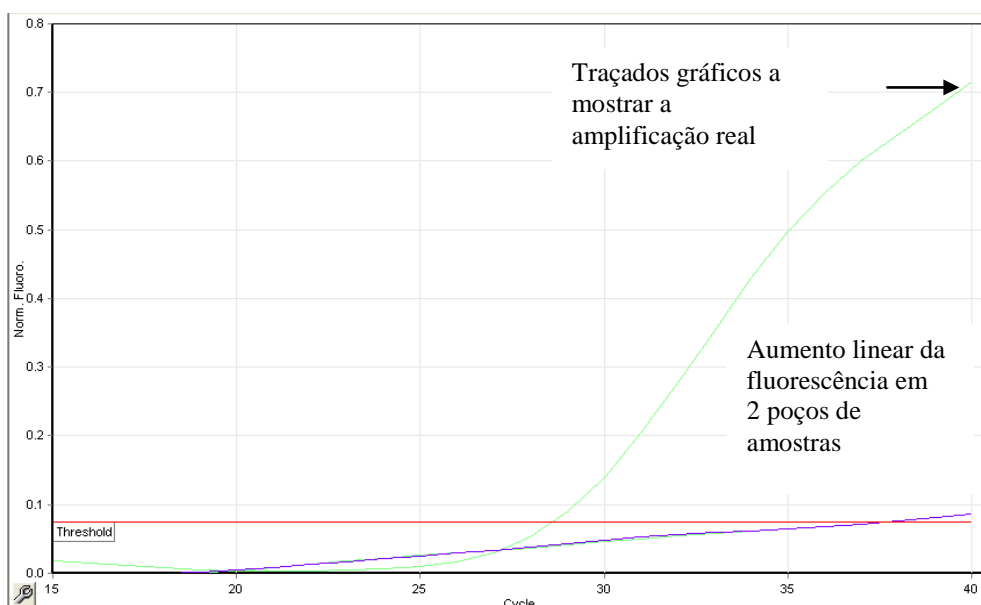


Figura 22. Exemplo de um aumento linear da fluorescência em dois poços de amostra.

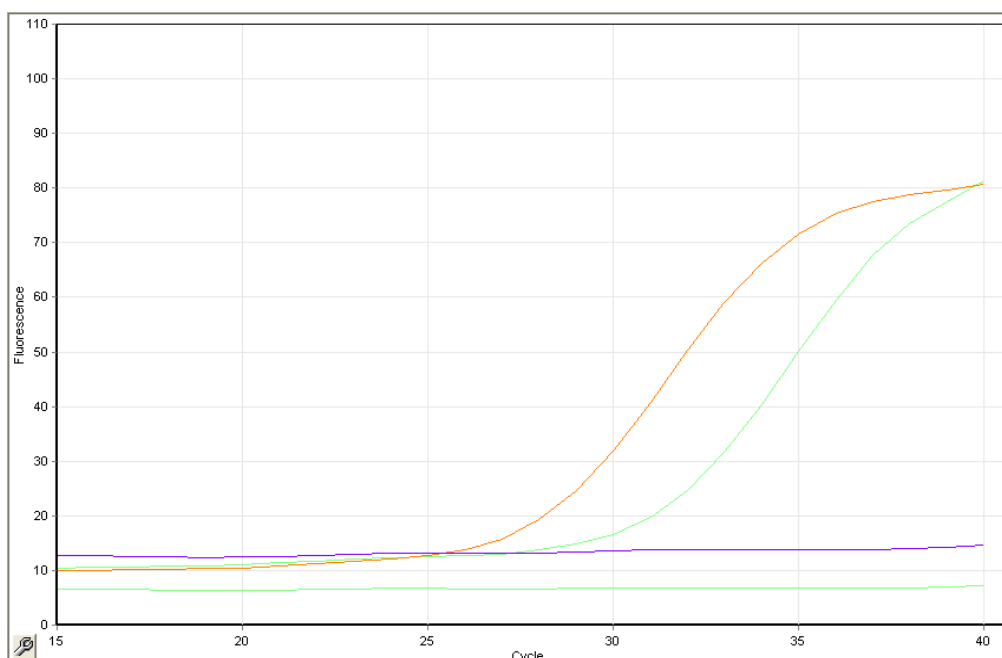


Figura 23. Fluorescência não específica da Figura 22.

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa ter sobre as informações e protocolos constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostras e testes (para informações de contacto, consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

Sem sinal com o Controlo Positivo (PC) EGFR no canal de fluorescência Cycling Green

- a) O canal de fluorescência seleccionado para a análise de dados de PCR não está em conformidade com o protocolo

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

Comentários e sugestões

- | | |
|--|--|
| b) Programação incorrecta do perfil de temperatura do equipamento Rotor-Gene | Compare o perfil de temperatura com o protocolo e, caso incorrecto, repita a execução. |
| c) Configuração incorrecta da PCR | Verifique os seus passos de trabalho relativamente ao esquema de pipetagem e repita a PCR, caso necessário. |
| d) As condições de armazenamento de um ou mais componentes do kit não estavam de acordo com as instruções indicadas em "Armazenamento e manuseamento de reagentes" (página 12) | Verifique as condições de armazenamento e a data do prazo de validade dos reagentes (ver o rótulo do kit) e, se necessário, utilize um novo kit. |
| e) O prazo de validade do Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR expirou | Verifique as condições de armazenamento e a data do prazo de validade dos reagentes (ver o rótulo do kit) e, se necessário, utilize um novo kit. |

Sinais com os controlos negativos no canal de fluorescência Cycling Green da PCR de análise

- | | |
|---|---|
| a) Ocorreu contaminação durante a preparação da PCR | <p>Repita a PCR com novos reagentes em réplicas.</p> <p>Se possível, feche os tubos de PCR imediatamente depois de adicionar a amostra a testar.</p> <p>Certifique-se de que o espaço e os equipamentos de trabalho são descontaminados a intervalos regulares.</p> |
| b) Ocorreu contaminação durante a extracção | <p>Repita a extracção e a PCR da amostra a testar utilizando novos reagentes.</p> <p>Certifique-se de que o espaço e os equipamentos de trabalho são descontaminados a intervalos regulares.</p> |

Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Total, certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR são testados quanto às especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto.

Limitações

Os resultados do produto devem ser interpretados no contexto de todos os achados clínicos e laboratoriais relevantes e não deverão ser utilizados para diagnóstico sem outros dados.

O produto deve ser utilizado apenas por pessoal especialmente formado e especializado em procedimentos de diagnóstico *in vitro* e no Rotor-Gene Q.

Os estudos de validação analítica foram elaborados com ADN humano extraído de amostras de tumor fixadas em formalina e conservadas em parafina.

O produto deve ser utilizado exclusivamente no ciclador PCR em tempo real do Rotor-Gene Q, série 5plex HRM.

Para a obtenção de resultados otimizados, é necessário o cumprimento estrito do manual do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Não se recomenda a diluição de reagentes não descritos neste manual, pois resultaria numa redução do seu desempenho.

É importante que a quantidade e qualidade do ADN na amostra seja avaliada antes de se efectuar a análise de amostras com o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. É fornecida mistura de reacção de controlo (Ctrl) adicional para determinar se o valor C_T é aceitável para o ensaio. Não devem ser utilizadas leituras de absorção pois não se correlacionam com os valores C_T em amostras de ADN fragmentado.

Devem-se observar os prazos de validade, as condições de armazenamento impressas na caixa e os rótulos de todos os componentes. Não utilize os componentes fora de prazo ou armazenados de forma incorrecta.

Características de desempenho

Cut-offs

Foram testadas 171 amostras FFPE utilizando um método que segue as indicações em NCCLS EP17-A (2004). Os dados de 159 amostras foram utilizados no estabelecimento de cut-offs do kit. O intervalo do C_T da reacção de controlo foi estabelecido como sendo um C_T entre 23,00 e 30,69. Os valores de cut-off foram estabelecidos e estão indicados no Quadro 8.

Limite de detecção (LOD)

Para determinar o LOD do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, foi desenvolvido um conjunto de amostras misturando ADN mutante sintético com ADN genómico de tipo selvagem para simular um intervalo de percentagens de mutação para cada uma das 29 mutações. O LOD de cada ensaio é definido como a percentagem de mutação à qual 95% das réplicas foram determinadas positivas pelo Kit *therascreen* EGFR PCR RGQ. Os valores de LOD estão indicados no Quadro 9. Para os ensaios multiplex, que detectam várias mutações (G719X, as deleções e as inserções), é indicado o valor da reacção que apresentou o LOD mais elevado.

Quadro 9. LODs de cada um dos sete ensaios de mutação EGFR

| Mutação | Percentagem de mutação detectável (%) |
|-----------|---------------------------------------|
| T790M | 7,02 |
| Delecções | 1,64 |
| L858R | 1,26 |
| L861Q | 0,50 |
| G719X | 5,43 |
| S768I | 1,37 |
| Inserções | 2,03 |

Precisão

Para determinar a precisão do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, foi desenvolvido um conjunto de amostras misturando ADN mutante sintético com ADN genómico de tipo selvagem para simular uma percentagem de mutação de baixo nível para cada um dos sete ensaios de mutação. A precisão foi avaliada testando amostras num local de testes, utilizando vários lotes do kit, vários operadores e várias execuções em vários dias diferentes, com duas réplicas de cada amostra. A variação observada, em termos do desvio padrão previsto da análise dos componentes de variação, foi inferior a 1 ΔC_T e pode ser utilizada como uma estimativa de precisão (Quadro 10).

Quadro 10. Resultados de testes feitos no laboratório*

| Ensaio | Percentagem de testes positivos quanto a mutação | Estimativa do desvio padrão (ΔC_T) |
|-----------|--|--|
| T790M | 100% | 0,33 |
| Delecções | 100% | 0,40 |
| L858R | 100% | 0,45 |
| L861Q | 100% | 0,49 |
| G719X | 97,9% | 0,59 |
| S768I | 97,9% | 0,31 |
| Inserções | 97,9% | 0,38 |

* Foram testadas 93 réplicas para cada mutação.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi avaliada testando amostras de alto nível de mutação num fundo de ADN genómico de tipo selvagem, em três locais de teste, utilizando vários lotes do kit, vários operadores e várias execuções em vários dias diferentes, com duas réplicas de cada amostra. Para todos os sete ensaios de mutação, 96,1 a 100% das amostras de ADN mutante produziram resultados positivos quanto a mutação. As amostras de tipo selvagem produziram resultados negativos quanto a mutação em todos os ensaios de todos os locais.

Efeito da concentração do ADN de entrada

Para determinar o efeito de alterar a concentração do ADN de entrada nos resultados produzidos pelo Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR perto do LOD, foi desenvolvido um conjunto de amostras para todas as 29 mutações, misturando ADN mutante sintético com ADN genómico de tipo selvagem, para produzir amostras a níveis de entrada total de ADN baixo, médio e alto.

Os níveis alto e baixo de entrada de ADN visavam representar o intervalo de valores de C_T do ensaio de controlo (23,50 a 29,50).

Uma avaliação do conjunto de dados de entrada de ADN (29 mutações, a concentrações perto do LOD e a três diferentes níveis de entrada de ADN) revelaram uma taxa de positivos quanto a mutação de 95,44%.

Estes dados indicam que variando o nível de entrada de ADN, dentro do intervalo de trabalho do ensaio, não tem impacto no ΔC_T ou na determinação da mutação de uma amostra.

Substâncias interferentes

Foi avaliado o efeito no desempenho do kit, de componentes que podem potencialmente transitar do kit QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue durante o processamento de amostras FFPE.

Formalina, cera de parafina, xileno, etanol, ATL do tampão, proteinase K, AL do tampão, tampão de lavagem AW1 e tampão de lavagem AW2 foram usados às concentrações previstas mais elevadas (“pior caso”) (assumindo que cada passo de lavagem ou de purificação do protocolo do kit de extracção resultou numa redução de 1 log no componente de concentração).

O estudo utilizou amostras 3x o LOD em vez de um nível de mutação muito maior para garantir que a potencial interferência podia ser detectada.

Para indicar uma potencial interferência, foi considerada uma diferença em ΔC_T de ≥ 3 desvios padrão (obtido do estudo de precisão) entre o “teste” e o “controlo” (ou seja., sem substância interferente).

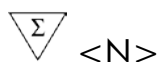
Nenhuma das substâncias interferentes avaliadas teve uma alteração do $\Delta C_T \geq 1$ desvio padrão quando comparadas com controlos.

Bibliografia

A QIAGEN mantém uma vasta base de dados online actualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem-lhe localizar os artigos de que necessita, quer através da pesquisa por uma única palavra-chave, quer especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa da bibliografia, visite a base de dados de referências da QIAGEN online em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

Símbolos



Contém reagentes suficientes para <N> testes



Prazo de validade



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*



Ref.^ª



Número de lote



Número do material



Componentes



Conteúdo



Número



Limitação de temperatura



Fabricante



Consultar instruções de utilização

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support, ligue para 00800-22-44-6000 ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Anexo: Dados das mutações

As IDs COSMIC são retiradas do *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Quadro 11. Lista de mutações e IDs COSMIC.

| Mutação | Exão | Mudança de base | ID COSMIC |
|------------------|------|--------------------------|-----------|
| T790M | 20 | 2369C>T | 6240 |
| L858R | 21 | 2573T>G | 6224 |
| L861Q | 21 | 2582T>A | 6213 |
| S768I | 20 | 2303G>T | 6241 |
| G719A | 18 | 2156G>C | 6239 |
| G719S | 18 | 2155G>A | 6252 |
| G719C | 18 | 2155G>T | 6253 |
| Inserções | 20 | 2307_2308ins9 | 12376 |
| | | 2319_2320insCAC | 12377 |
| | | 2310_2311insGGT | 12378 |
| Delecções | 19 | 2235_2249del15 | 6223 |
| | | 2235_2252>AAT (complexo) | 13551 |
| | | 2236_2253del18 | 12728 |
| | | 2237_2251del15 | 12678 |
| | | 2237_2254del18 | 12367 |
| | | 2237_2255>T (complexo) | 12384 |
| | | 2236_2250del15 | 6225 |
| | | 2238_2255del18 | 6220 |
| | | 2238_2248>GC (complexo) | 12422 |
| | | 2238_2252>GCA (complexo) | 12419 |
| | | 2239_2247del9 | 6218 |
| | | 2239_2253del15 | 6254 |

Quadro 11. Lista de mutações e IDs COSMIC (continuação)

| Mutação | Exão | Mudança de base | ID COSMIC |
|------------------|-------------|----------------------------------|------------------|
| Delecções | 19 | 2239_2256del18 | 6255 |
| | | 2239_2248TTAAGAGAAG>C (complexo) | 12382 |
| | | 2239_2258>CA (complexo) | 12387 |
| | | 2240_2251del12 | 6210 |
| | | 2240_2257del18 | 12370 |
| | | 2240_2254del15 | 12369 |
| | | 2239_2251>C (complexo) | 12383 |

Informações para encomendar

| Produto | Conteúdo | Ref. ⁹ |
|--|---|-------------------|
| <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24) | Para 24 reacções: 1 ensaio de controlo, 7 ensaios de mutação, controlo positivo, polimerase <i>Taq</i> do ADN | 870111 |
| Rotor-Gene Q e acessórios | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Ciclador de PCR em tempo real e analisador de Fusão de Alta Resolução (HRM) com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e do serviço da assistência; instalação e formação não incluídos | 9002033 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Ciclador de PCR em tempo real e analisador de Fusão de Alta Resolução (HRM) com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e do serviço da assistência; instalação e formação | 9002032 |
| Rotor-Gene Q 5plex HRM System | Ciclador de PCR em tempo real e analisador de Fusão de Alta Resolução (HRM) com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e do serviço da assistência; instalação e formação não incluídos | 9001650 |
| Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform | Ciclador de PCR em tempo real e analisador de Fusão de Alta Resolução (HRM) com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e do serviço da assistência; instalação e formação | 9001580 |

| Produto | Conteúdo | Ref.ª |
|--|---|--------------|
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Bloco de alumínio para configuração de reacção manual com uma pipeta de canal único em 72 tubos de 0,1 ml | 9018901 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reacções | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10.000 reacções | 981106 |

Para informações actualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respectivo manual do kit QIAGEN ou do utilizador. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

A aquisição deste produto permite ao comprador utilizá-lo para o desempenho de serviços de diagnóstico em diagnósticos *in vitro* humanos. Não se garante nenhuma patente geral ou qualquer outro tipo de licença para além deste direito específico de utilização concedido no momento da aquisição.

Marcas registadas: QIAGEN®, QIAamp®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Limited); FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.).

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

Contrato de Licença Limitada para o kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

A utilização deste produto implica a aceitação por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto dos 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 à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual, e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou optimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados nem ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do Kit concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou facilitar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao Kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.

© 2012–2013 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

