

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



Versão 1

IVD

Para utilização em diagnóstico *in vitro*
Para utilização com os equipamentos Rotor-Gene[®] Q MDx

CE

REF 870311

 QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House,
Lloyd Street North, Manchester, M15 6SH, RU

R1 **MAT** 1090234PT



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 alta 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.

Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação	4
Princípio do procedimento	5
Materiais fornecidos	7
Conteúdo do kit	7
Materiais necessários mas não fornecidos	8
Advertências e precauções	10
Informações de segurança	10
Precauções gerais	10
Armazenamento e manuseamento de reagentes	11
Armazenamento e manuseamento de amostras	12
Procedimento	13
Protocolos	
■ 1: Detecção de mutações EGFR	14
■ 2: Configuração do Rotor-Gene Q EGFR	18
Guia de resolução de problemas	33
Controlo de qualidade	34
Limitações	34
Características de desempenho	35
Referências	41
Símbolos	42
Informações de contacto	42
Anexo A: Pormenores das mutações	43
Informações para encomendar	44

Utilização prevista

O Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR é um teste de diagnóstico *in vitro* para a detecção de deleções no exão 19 e substituições no exão 20 e 21 (T790M e L858R, respectivamente) no gene do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) e fornecerá uma avaliação qualitativa do estado de mutação. Os resultados destinam-se a ajudar o médico a identificar doentes com NSCLC que possam beneficiar do tratamento com IRESSA (gefitinib), quando não for possível avaliar uma amostra de tecido.

O Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR deve ser utilizado por pessoal com a devida formação, num ambiente de laboratório profissional, com amostras de ADN extraídas de plasma obtido de sangue de paciente com cancro do pulmão de não-pequenas células (NSCLC).

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

Resumo e explicação

O Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR é um kit pronto a usar para a detecção de mutações no gene EGFR relacionado com o cancro, utilizando reacção de polimerização em cadeia (PCR) em equipamentos Rotor-Gene Q MDx.

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

- Deleções no exão 19
- T790M
- L858R

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

Princípio do procedimento

O Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR utiliza 2 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 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 exibe 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 tipo 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 resulta num aumento da fluorescência do tubo de reacção.

Formato do kit

O Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR é fornecido com 4 ensaios:

- 1 ensaio de controlo (Ctrl)
- 3 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.

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.

Ensaio de mutação

Cada ensaio de mutação contém uma sonda Scorpions etiquetada com FAM e um iniciador ARMS para a 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 4. O Kit *therascreen* EGFR Plasma 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 execução deve conter um controlo negativo ("controlo sem modelo", NTC) nos tubos 9–12. O NTC consiste em água isenta de nuclease (H₂O) usada como o "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 CT (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

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
Ref.º			870311
Número de reacções			24
Vermelho	Control Reaction Mix (Mistura de 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 deleccões)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (Mistura de reacção de L858R)	L858R	600 µl
Bege	EGFR Positive Control (Controlo positivo EGFR)	PC	300 µl
Verde- menta	Taq DNA Polymerase (Polimerase Taq de ADN)	Taq	2 x 80 µl
Branco	Água isenta de nuclease para controlo sem modelo	NTC	1 x 1,9 ml
Branco	Água isenta de nuclease para diluição	Dil	1 x 1,9 ml

Materiais necessários mas não fornecidos

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

- Kit de extracção de ADN (consulte “Procedimento”, página 13)
- Pipetas* de uso exclusivo (ajustáveis) para a preparação de amostras
- Pipetas* de uso exclusivo (ajustáveis) para a preparação de mistura principal de PCR
- Pipetas* de uso exclusivo (ajustáveis) 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)
- Banho-maria ou dispositivo semelhante com capacidade para tubos centrifugados de 50 ml a 60 °C.
- Bloco de aquecimento ou dispositivo semelhante com capacidade para incubar a 56 °C*
- Gelo picado
- Centrífuga de bancada* com rotor de tubos de reacção de 2 ml
- Vortex
- Equipamento Rotor-Gene Q MDx*‡ com canais de fluorescência para Cycling Green e Cycling Yellow (detecção de FAM e HEX, respectivamente)
- Software do Rotor-Gene Q, versão 2.3

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

Esta não é uma lista completa de fornecedores.

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

‡ Em alguns países, se aplicável, pode ser utilizado um equipamento Rotor-Gene Q 5plex HRM com data de produção de Maio de 2011 ou posterior. A data de produção pode ser obtida a partir do número de série no verso do equipamento. O número de série está no formato “mmaannn”, em que “mm” indica o mês de produção, “yy” indica os últimos dois algarismos do ano de produção e “nnn” indica o identificador exclusivo do equipamento.

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (Tiras de tubos e tampas, 0,1 ml), para utilizar com rotor de 72 poços (Ref.º 981103 ou 981106)
- Tubos de microcentrifugação isentos de DNase, RNase e ADN para a preparação de misturas principais
- Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes, 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.º 9018901)

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Para utilização profissional

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 SDS de cada kit QIAGEN e componente do kit.

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. É necessário efectuar a preparação e distribuição das misturas de reacção numa área diferente da utilizada para adição do modelo. Os tubos do Rotor-Gene Q não podem ser abertos depois de terminada a execução de PCR. Este procedimento serve para evitar a contaminação laboratorial com produtos pós-PCR.

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

Nota: todos os reagentes do Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR foram formulados especificamente para serem utilizados com os testes indicados. Todos os reagentes fornecidos no Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR destinam-se a ser utilizados unicamente com os outros reagentes no mesmo Kit *therascreen* EGFR Plasma 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 Plasma 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, dado que aumenta o risco de falsos negativos.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

O Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR é expedido em gelo seco. Se qualquer componente do Kit *therascreen* EGFR Plasma 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, as instruções de utilização ou os reagentes, contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica QIAGEN ou os distribuidores locais (visite-nos em www.qiagen.com).

O Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR deverá ser armazenado imediatamente após ser recebido, a uma temperatura entre -15 e -30 °C num congelador de temperatura constante e protegido da luz. Quando armazenado nas condições de armazenamento especificadas, o Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR permanecerá estável até à data do prazo de validade.

Uma vez abertos, os reagentes podem ser armazenados nas respectivas embalagens originais entre -15 e -30 °C durante 90 dias ou até à data do prazo de validade, o que ocorrer primeiro. Deve evitar-se o descongelamento e congelamento sucessivos. Não exceda um máximo de 8 ciclos de congelamento/descongelamento.

Os reagentes devem ser descongelados à temperatura ambiente durante um mínimo de 1 hora e um máximo de 4,5 horas. Assim que os reagentes estejam prontos para usar, as reacções da PCR podem ser preparadas. Os tubos do Rotor-Gene Q que contêm as misturas principais e a amostra de ADN, podem

ser carregados imediatamente no equipamento Rotor-Gene Q MDx. O tempo total antes da execução, uma vez preparadas as reacções da PCR, não deverá exceder:

- 7 horas se armazenado à temperatura ambiente

Nota: este tempo inclui a preparação da PCR e o armazenamento.

- 18 horas se armazenado no frigorífico (2 a 8 °C)

Nota: este tempo inclui a preparação da PCR e o armazenamento.

Nota: os Scorpions (tal como todas as moléculas etiquetadas com fluorescência) nos reagentes da mistura de reacção são muito sensíveis. Proteja os controlos e os reagentes da mistura de reacção da luz para evitar a sua foto-descoloração.

Os reagentes do Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR estão diluídos numa concentração otimizada e não é necessário qualquer outro tratamento ou purificação antes da sua utilização na análise conforme indicado nas *instruções de utilização (manual) do Kit therascreen EGFR Plasma RGQ PCR*.

Devem ser observados os prazos de validade e as condições de armazenamento impressas na caixa e nas etiquetas de todos os componentes. Não utilize componentes fora de prazo de validade ou armazenados de forma incorrecta.

Armazenamento e manuseamento de amostras

Nota: todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente infeccioso.

O material das amostras deve ser ADN genómico humano extraído de plasma. As amostras devem ser transportadas de acordo com a metodologia de patologia normal, para assegurar a qualidade das amostras.

Procedimento

Extracção do ADN

As características de desempenho deste kit foram geradas utilizando ADN extraído com o Kit QIAamp® Circulating Nucleic Acid (ref.ª 55114). Ao utilizar o Kit QIAamp Circulating Nucleic Acid, efectue a extracção do ADN de acordo com as instruções descritas no manual de instruções, tendo em atenção o seguinte:

- O volume inicial de plasma é 2 ml.
- Antes da extracção de ADN, os 2 ml de plasma devem ser centrifugados a 3000 rpm durante 2 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo limpo.
- O volume de Proteinase K deve ser 250 µl.
- A digestão de Proteinase K deve ser efectuada durante 1 hora a 60 °C.
- O ADN genómico purificado tem de ser eluído em 55 µl de tampão AVE (fornecido no kit QIAamp Circulating Nucleic Acid).
- Armazene o ADN genómico purificado entre -15 e -30 °C.

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

Protocolo 1: Detecção de mutações EGFR

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- Antes de iniciar o procedimento, leia “Precauções gerais”, na página 10.
- É conveniente familiarizar-se durante algum tempo com o equipamento Rotor-Gene Q MDx antes de iniciar o protocolo. Consulte o manual de utilizador do equipamento.
- Não misture com agitação forte a polimerase *Taq* de ADN (*Taq*) nem qualquer mistura que contenha polimerase *Taq* de ADN, pois isso poderia desactivar a enzima.
- Podem ser executadas até 16 amostras numa placa
- 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 durante pelo menos 1 hora e no máximo 4,5 horas 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 completamente todas as misturas de reacção, a água isenta de nuclease para Controlo Sem Modelo (NTC) e o EGFR Positive Control (PC) (Controlo Positivo EGFR) à temperatura ambiente (15 a 25 °C) durante pelo menos uma 1 hora. 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.**

Tabela 1. Tempos de descongelação, tempos de preparação da PCR e temperaturas de armazenamento

Tempo de descongelação		Temperatura de armazenamento após preparação da PCR	Tempo máximo de preparação e armazenamento da PCR
Mínimo	Máximo		
1 hora	4,5 horas	Temperatura ambiente (15 a 25 °C)	7 horas
1 hora	4,5 horas	2 a 8 °C	18 horas

Nota: a preparação da PCR deve ser realizada à temperatura ambiente. O termo “Armazenamento” refere-se ao tempo entre a conclusão da preparação da PCR e o início da execução da PCR no equipamento Rotor-Gene Q MDx.

Nota: a polimerase *Taq* de ADN (tubo *Taq*) deve ser trazida para a temperatura ambiente (15 a 25 °C) ao mesmo tempo que os outros reagentes (consulte “Armazenamento e manuseamento de reagentes”, na página 11). Centrifugue o tubo com brevidade para recolher a enzima no fundo do tubo.

- 2. Etiqueta 4 tubos de microcentrifugação (não fornecidos), de acordo com cada uma das misturas de reacção correspondentes indicadas na Tabela 2. Prepare misturas principais (mistura de reacção de controlo ou de mutação [CTRL em tubo, T790M, Delecções, L858R] + Polimerase *Taq* de ADN [*Taq*]) que sejam suficientes para as amostras de ADN, uma reacção de Controlo Positivo (PC em tubo) EGFR e uma reacção de água isenta de nuclease para controlo sem modelo (NTC em tubo), de acordo com os volumes indicados na Tabela 2. Inclua reagentes para 1 amostra suplementar para permitir uma quantidade extra suficiente para a configuração da PCR. As misturas principais contêm todos os componentes necessários para a PCR, excepto a amostra.**

Tabela 2. Preparação das misturas principais*

Ensaio	Tubo de mistura de reacção	Volume da mistura de reacção	Volume da polimerase Taq de ADN (Taq em tubo)
Controlo	CTRL	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)
T790M	T790M	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)
Delecções	Del	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)
L858R	L858R	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)

* Quando preparar a mistura principal, prepare o suficiente para 1 amostra suplementar para garantir quantidade suficiente para a configuração da PCR

Nota: quando preparar a mistura principal, o volume necessário de mistura de reacção de controlo ou de mutação é adicionado em primeiro lugar ao tubo relevante, e a polimerase *Taq* de ADN é adicionada por último.

- 3. Coloque o número apropriado de tubos de 4 tiras de PCR (cada tira tem 4 tubos) no bloco de carregamento de acordo com a configuração apresentada na Tabela 3. Não coloque tampas nos tubos.**

Nota: deixe as tampas no recipiente de plástico até serem necessárias.

- 4. Tape o tubo de mistura principal e inverta 10 vezes para misturar a mistura principal seguido de uma breve centrifugação para garantir que a mistura fica no fundo do tubo. Acrescente imediatamente 20 µl de mistura principal a cada tubo de tira PCR apropriado.**
- 5. 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 12) e coloque a tampa nos tubos.**
- 6. Adicione 5 µl de cada amostra aos tubos de amostra (tubos de PCR 5–8, 13–16 e 17–72) e coloque-lhes as tampas.**
- 7. Adicione 5 µl de Controlo Positivo (PC) EGFR aos tubos de controlo positivo (tubos de PCR 1 a 4). Cada amostra de ADN deve ser testada com todos os ensaios de mutação e de controlo. A configuração é apresentada na Tabela 3.**

Tabela 3. 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
Número de amostra									
Ensaio	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ctrl	5	13	21	29	37	45	53	61	69
T790M	6	14	22	30	38	46	54	62	70
Delecções	7	15	23	31	39	47	55	63	71
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72

8. Utilizando um marcador permanente, marque as tampas dos primeiros tubos na posição numérica mais baixa em cada um dos tubos de 4 tiras de PCR (por ex., posições 1, 5 e 9, etc.) para indicar a orientação para carregar os tubos no rotor de 72 poços do equipamento Rotor-Gene Q MDx.
9. Coloque todos os tubos de 4 tiras PCR nas posições adequadas no rotor de 72 poços 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.
10. Se o rotor não ficar totalmente ocupado, preencha os espaços restantes com tubos vazios com tampa.
11. Coloque imediatamente o rotor no equipamento Rotor-Gene Q MDx. Certifique-se de que o anel de aperto (acessório do equipamento Rotor-Gene Q MDx) é colocado por cima do rotor para prender os tubos durante a execução.
12. Consulte a configuração do equipamento Rotor-Gene Q MDx (consulte "Protocolo 2: Configuração do Rotor-Gene Q EGFR", na página 18) para criar o perfil de temperatura e iniciar a execução.

Protocolo 2: Configuração do Rotor-Gene Q EGFR

Em resumo, os parâmetros de ciclagem são os seguintes.

Tabela 4. Parâmetros de ciclagem

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

1. Faça duplo clique sobre o ícone do software do Rotor-Gene Q, versão 2.3 no ambiente de trabalho do PC ligado ao Rotor-Gene Q MDx. Seleccione o separador "Advanced" (Avançadas) na caixa de diálogo "New Run" (Nova execução) que é apresentada.
2. Para criar um novo modelo, seleccione "Empty Run" (Execução vazia) e, em seguida, clique em "New" (Novo) para introduzir o "New Run Wizard" (Assistente de nova execução).
3. Seleccione o "72-Well Rotor" (Rotor de 72 poços) como modelo 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) (consulte a Figura 1).

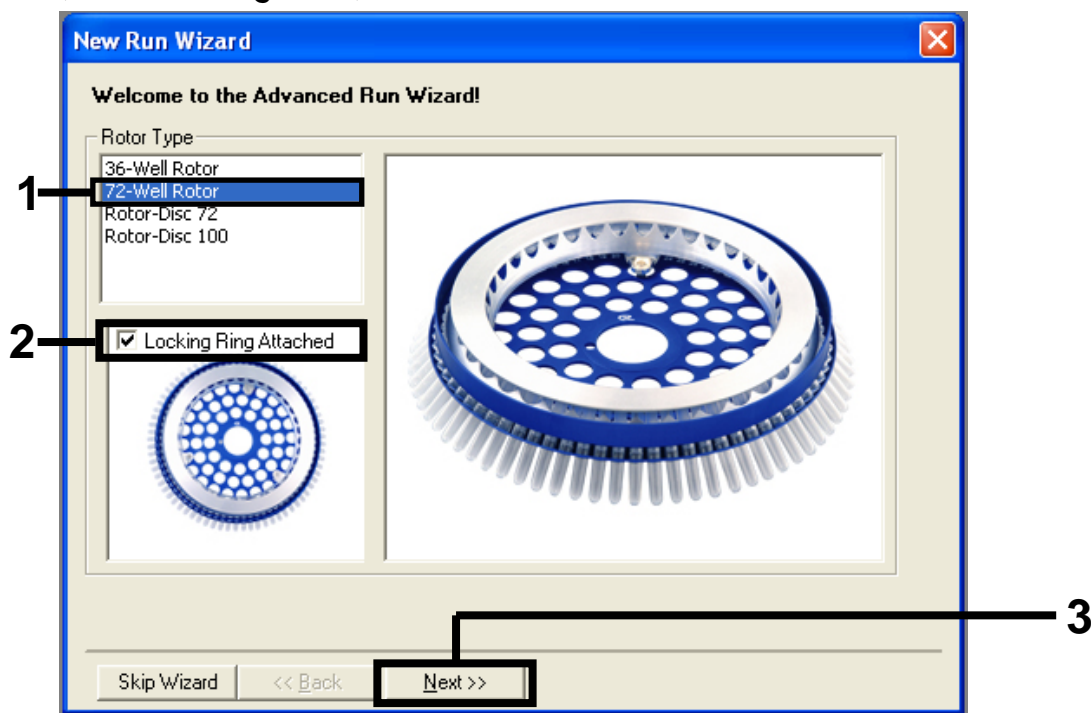


Figura 1. A caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de nova execução).

4. Introduza o nome do operador. Adicione as notas que desejar e introduza 25 em "Reaction Volume" (Volume de reacção). Certifique-se de que "Sample Layout" (Disposição das amostras) indica "1, 2, 3...". Clique em "Next" (Seguinte) (consulte a Figura 2).

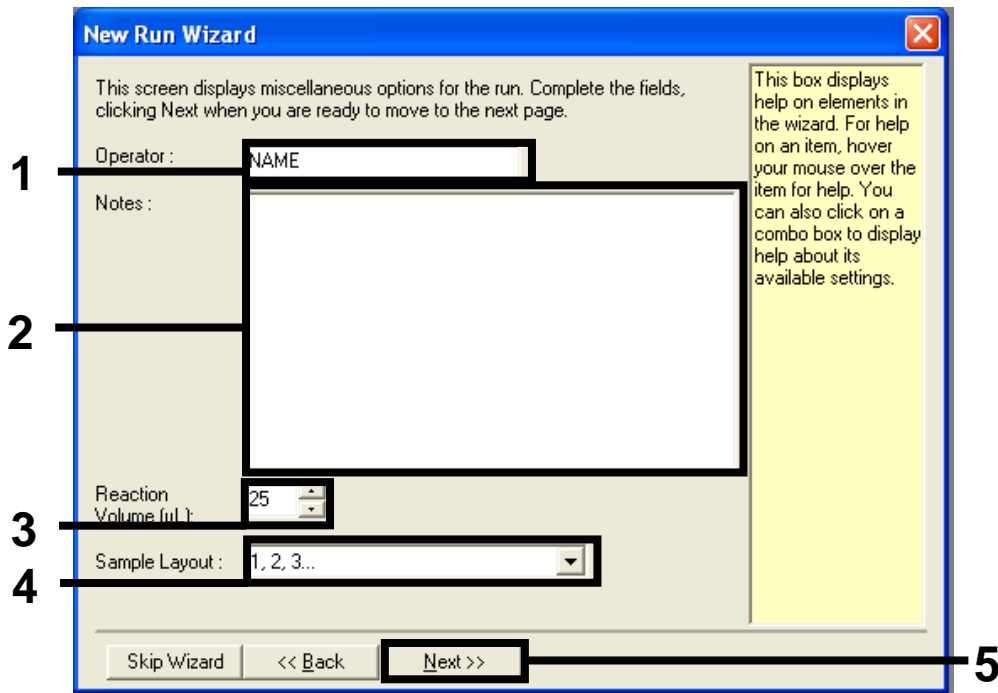


Figura 2. Introdução do nome do operador e do volume de reacção.

5. Clique no botão "Edit Profile" (Editar perfil) na caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de nova execução) (consulte a Figura 3) e programe os parâmetros da execução de acordo com os seguintes passos.

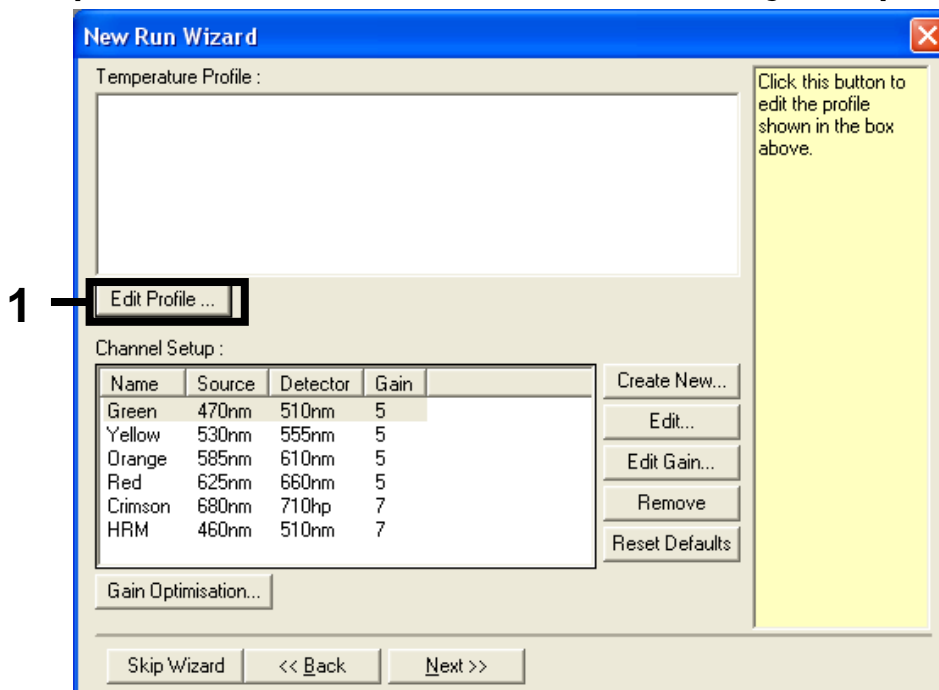


Figura 3. Edição do perfil.

6. Clique no botão "Insert after" (Inserir a seguir) e selecione "New Hold at Temperature" (Nova temperatura em espera) (consulte a Figura 4).

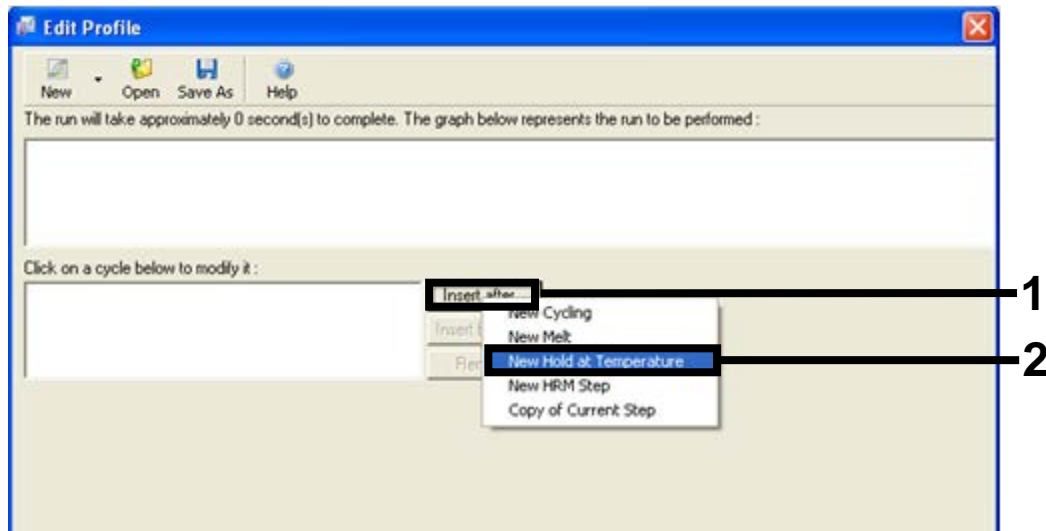


Figura 4. Inserção de um passo inicial de incubação.

7. Altere "Hold Temperature" (Temperatura em espera) para 95 °C e "Hold Time" (Tempo em espera) para 15 min. 0 segs. Clique no botão "Insert After" (Inserir a seguir) e, em seguida, selecione "New Cycling" (Nova ciclagem) (consulte a Figura 5).

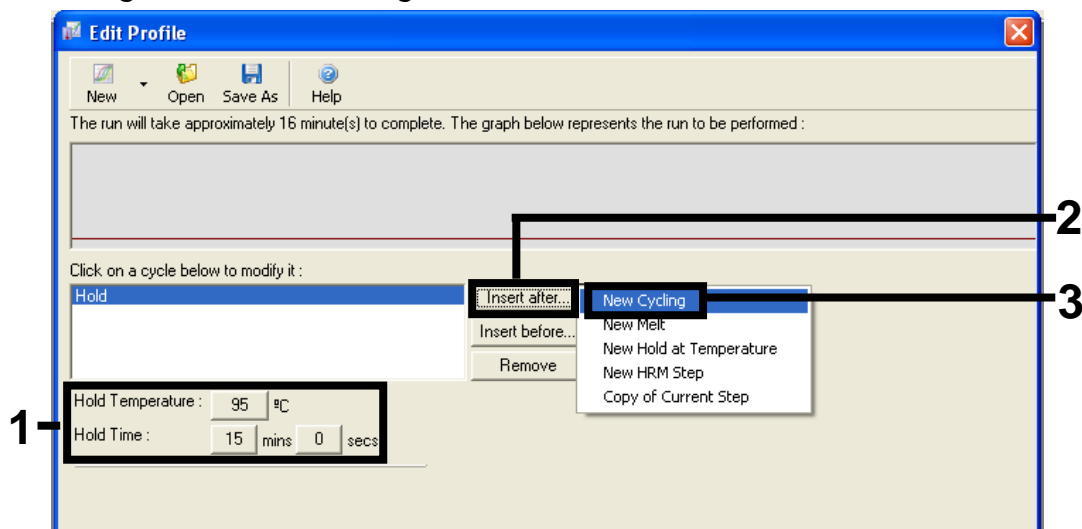


Figura 5. Passo inicial de incubação a 95 °C.

8. Altere o número de repetições de ciclo para 40. Selecione o primeiro passo e defina para "95°C for 30 secs" (95 °C durante 30 segundos) (consulte a Figura 6).

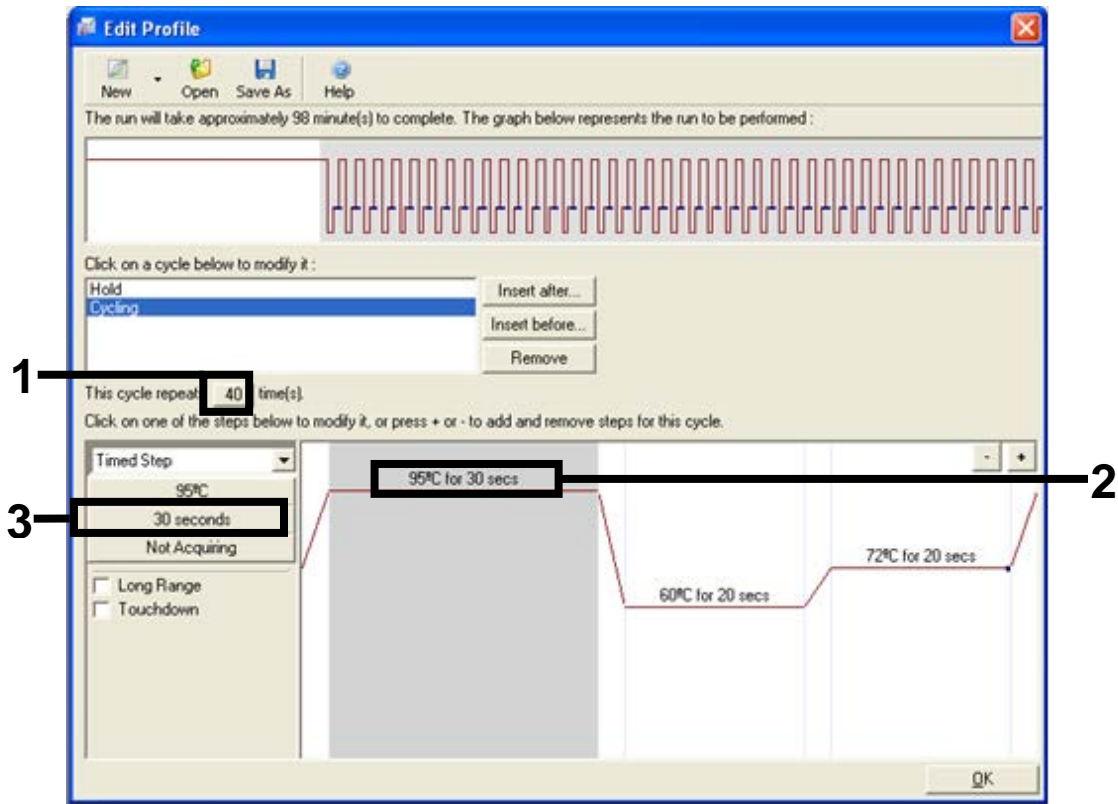


Figura 6. Passo de ciclagem a 95 °C.

9. Destaque o segundo passo e defina para "60°C for 60 secs" (60 °C durante 60 segundos). Active a aquisição de dados durante este passo, seleccionando o botão "Not Acquiring" (Não adquirir dados) (consulte a Figura 7).

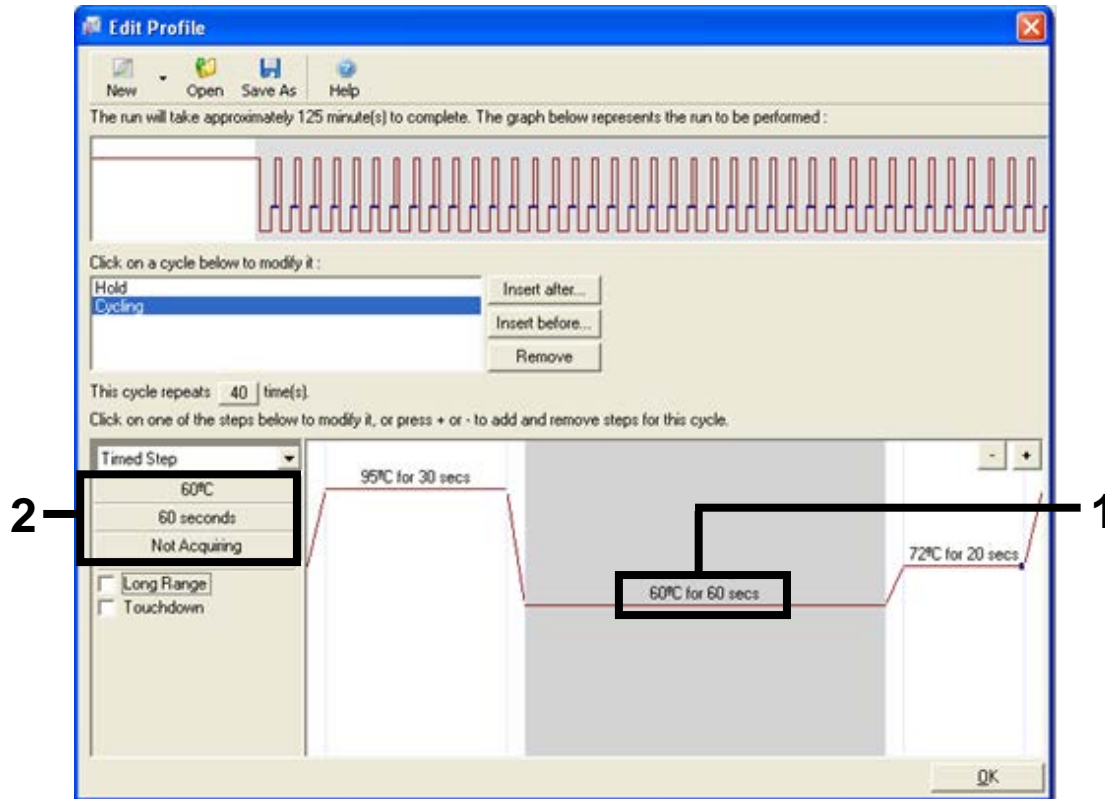


Figura 7. Passo de ciclagem a 60 °C.

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

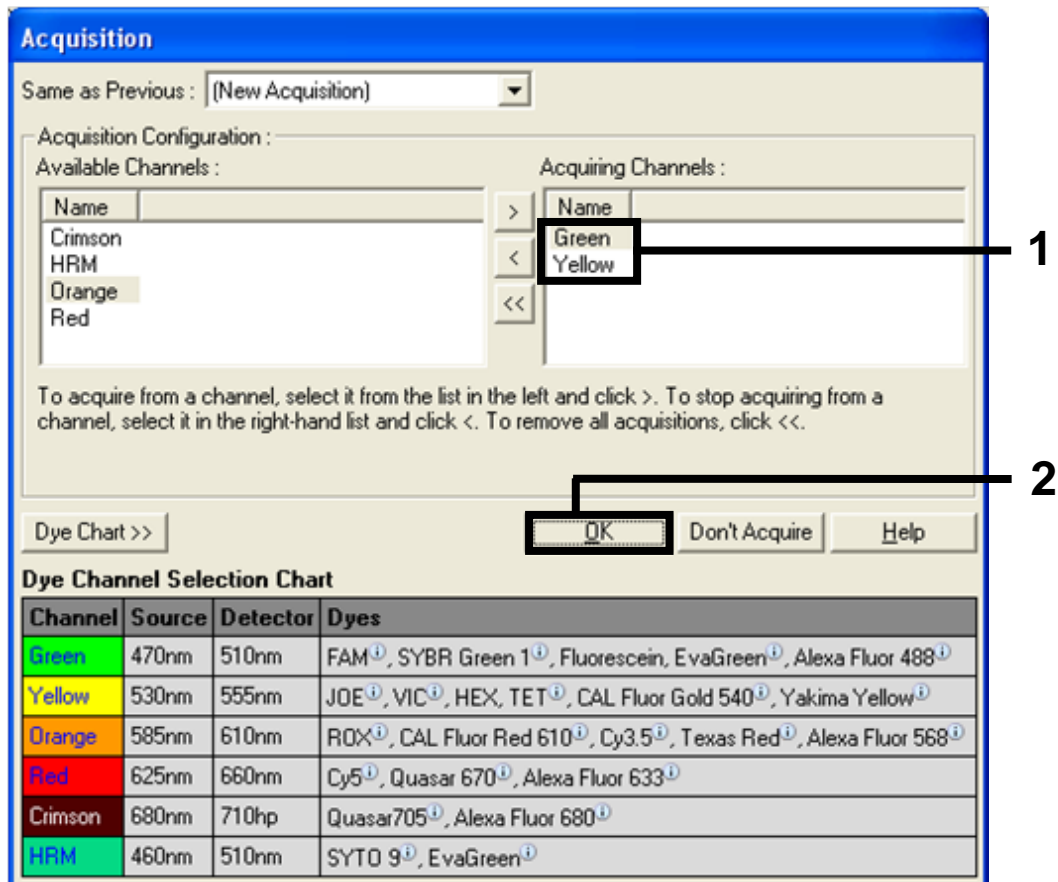


Figura 8. Aquisição de dados no passo de ciclagem de 60 °C.

11. Coloque em destaque o terceiro passo e elimine clicando o botão “-”.
Clique em “OK” (consulte a Figura 9).

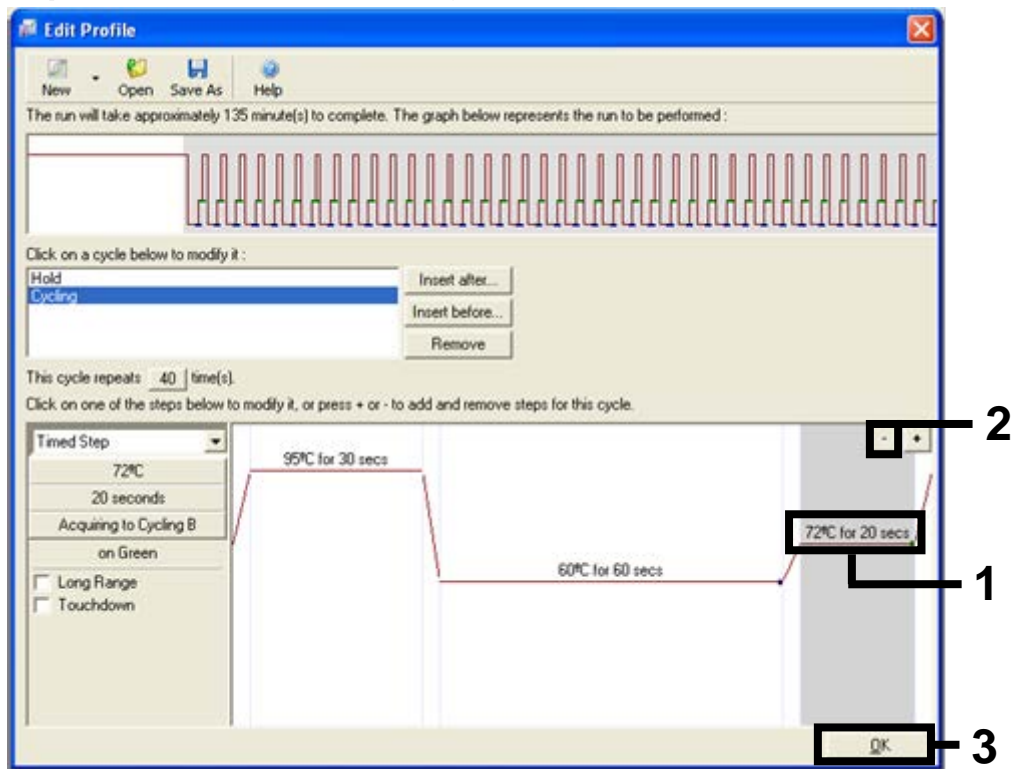


Figura 9. Remoção do passo de extensão.

12. Na caixa de diálogo seguinte, clique no botão “Gain Optimisation” (Optimização de aquisição de dados) (consulte a Figura 10).

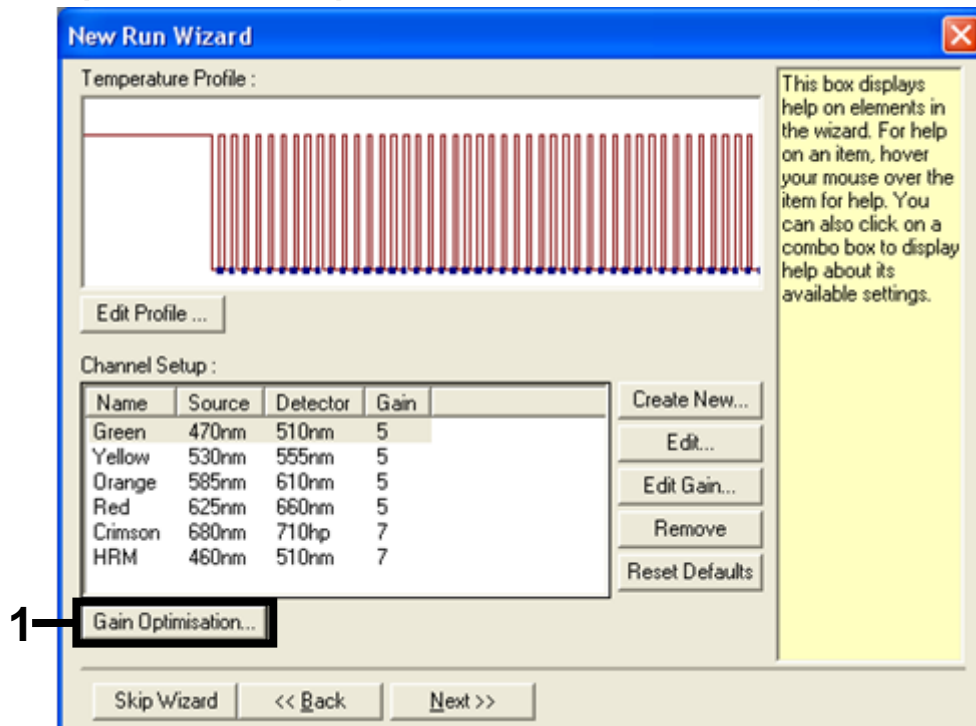


Figura 10. Optimização de aquisição de dados.

13. Clique no botão "Optimise Acquiring" (Optimizar aquisição). Aparecem as definições de canal para cada canal. Aceite estes valores predefinidos, clicando "OK" para ambos os canais (consulte a Figura 11).

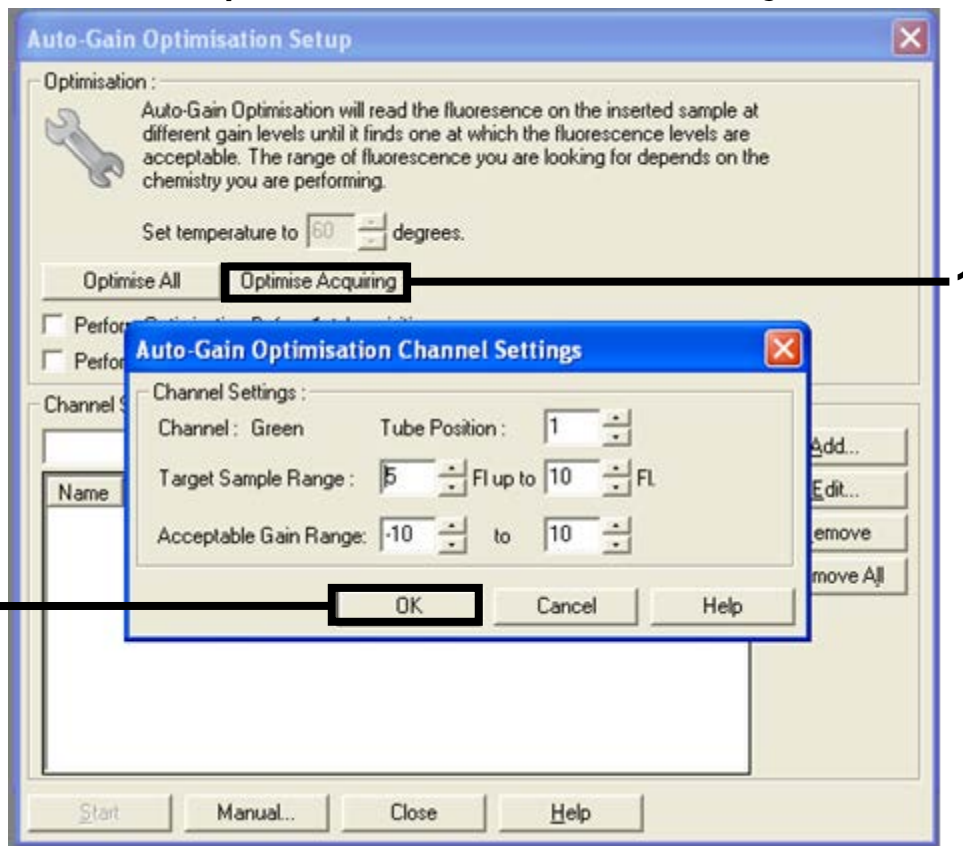


Figura 11. Optimização de auto-aquisição de dados para o canal verde.

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

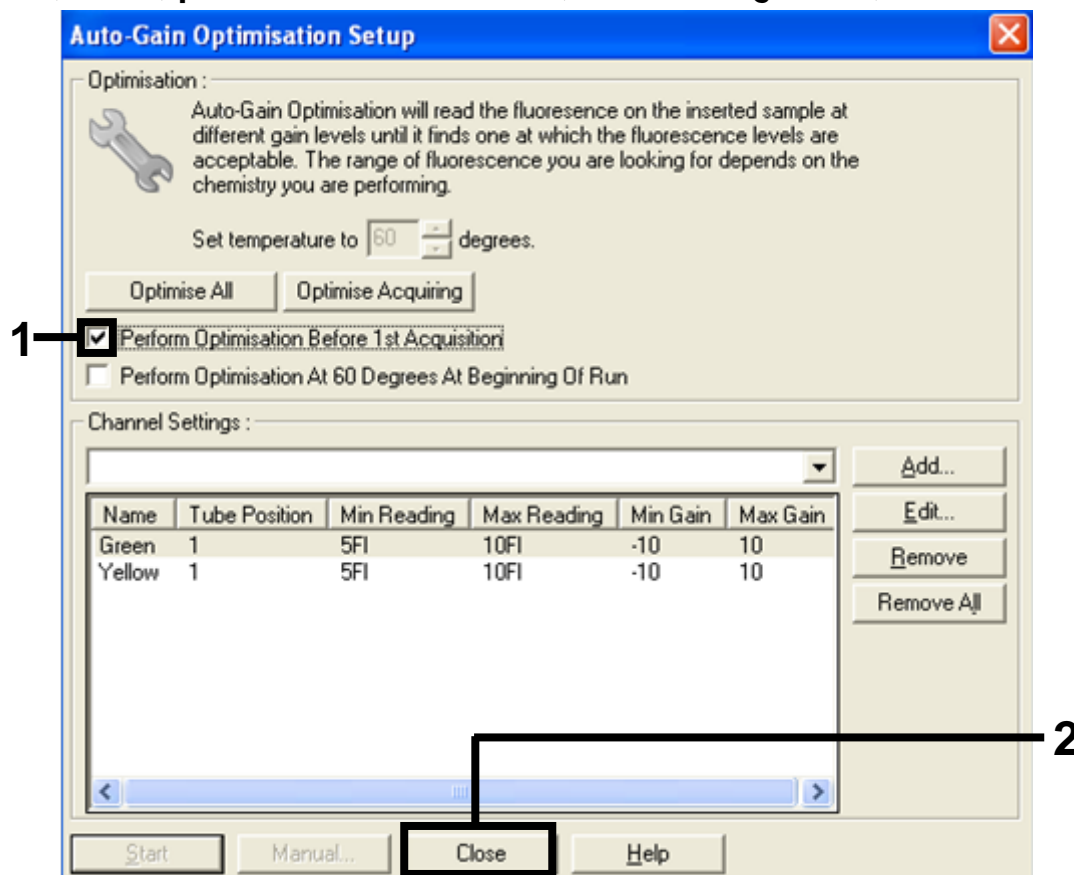


Figura 12. Selecção dos canais verde e amarelo.

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

Análise de dados de avaliação de mutações

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

Definições de análise do software

1. Abra o ficheiro adequado, com a série 2.3 do software do Rotor-Gene Q.
2. Se as amostras não tiverem sido nomeadas antes da execução, clique em “Edit samples” (Editar amostras).
3. Insira os nomes das amostras na coluna “Name” (Nome).
Nota: deixe em branco os nomes de quaisquer poços vazios.
4. Clique em “Analyse” (Análise). Na página de análise, clique em “Cycling A. Yellow” (Ciclagem A. 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. Clique em “Take Off Adj.” (Ajuste de remoção) e introduza 15,01 e 20,01 conforme mostrado na Figura 13.

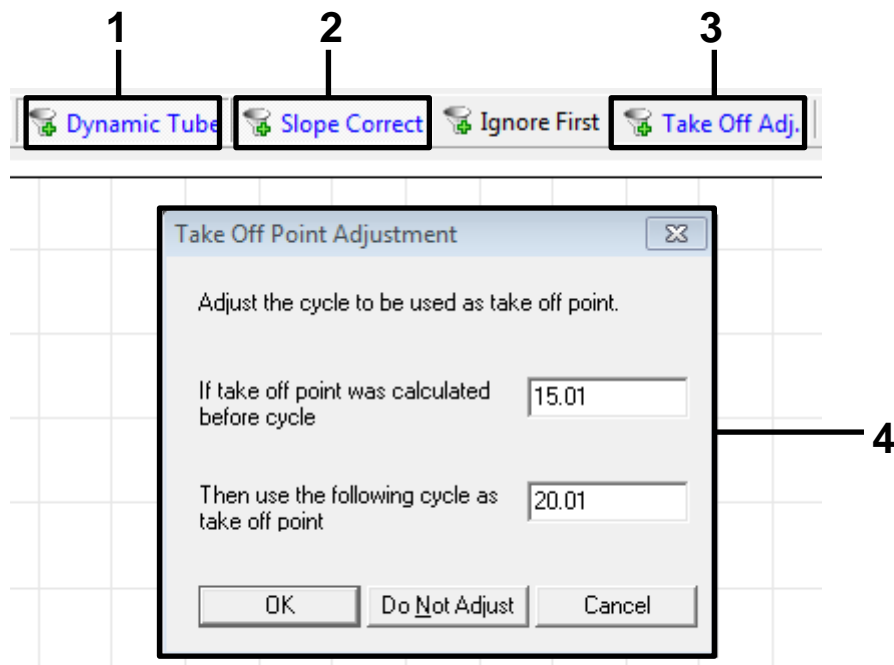


Figura 13. Definições de normalização de análise de EGFR. 1 = botão “Dynamic Tube” (Tubo dinâmico), 2 = botão “Slope Correct” (Declive correcto), 3 = botão “Take Off Adj.” (Ajuste de remoção), 4 = janela de diálogo “Take Off Point Adjustment” (Ajuste de ponto de remoção) com valores de parâmetros.

7. Defina o limiar em 0,02 e verifique os valores de C_T de HEX.
8. Na página de análise, clique em “Cycling A. Green” (Ciclagem A. Verde) para visualizar o canal FAM. Definir os parâmetros conforme a Figura 13 acima.
9. O tubo dinâmico deve estar destacado. Clique em “Slope Correct” (Declive correcto) e “Linear Scale” (Escala linear).
10. Defina o limiar em 0,075 e verifique os valores de C_T de FAM.

Executar análise de controlo

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

- Controlo negativo: para garantir que não está presente qualquer contaminação dos modelos, o NTC não deve gerar um valor de C_T no canal verde (FAM) abaixo de 40. Para garantir que a execução foi configurada correctamente, o controlo sem modelo (NTC) deve apresentar uma amplificação entre 29,85 e 35,84 no canal amarelo (HEX) (controlo interno).

Se houver amplificação positiva no canal verde e/ou amplificação fora do intervalo 29,85 a 35,84 no canal amarelo, a execução é inválida.

- Controlo positivo: o EGFR Positive Control (Controlo positivo EGFR) (PC) tem de apresentar um valor C_T para cada mistura de reacção dentro, inclusive, do intervalo estabelecido na Tabela 5. Um ensaio com um valor de controlo positivo fora deste intervalo indica um problema de configuração do ensaio e a execução deve ser considerada como falhada. Se o C_T do controlo positivo estiver dentro do intervalo (FAM), mas o C_T (HEX) do controlo interno se encontrar fora de intervalo 29,85 a 35,84, continue com a análise.

Nota: os dados de amostra não deverão ser utilizados se o controlo negativo ou positivo falhar.

Tabela 5. Intervalo C_T aceitável para controlos da execução

Controlo de reacção	Ensaio	Canal	Intervalo C_T
Controlo Positivo	Controlo	Verde (FAM)	28,13–34,59
	T790M	Verde (FAM)	30,22–34,98
	Delecções	Verde (FAM)	28,90–34,90
	L858R	Verde (FAM)	29,97–34,81
Controlo sem modelo	Todas as 8 misturas de reacção	Verde (FAM)	$\geq 40,00$
		Amarelo (Hex)	29,85–35,84

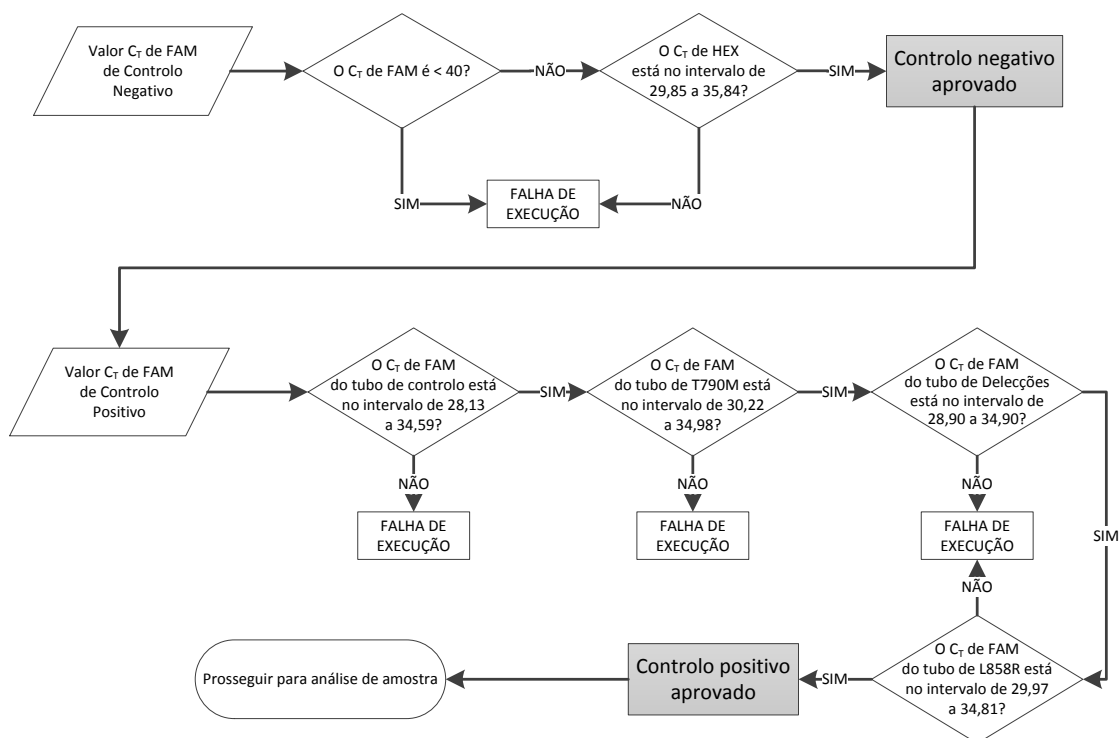


Figura 14. Fluxo de trabalho de execução de análise de controlo.

Desde que ambos os controlos de execução sejam válidos, o valor C_T do ensaio de controlo de cada amostra deverá encontrar-se dentro do intervalo de 23,70 a 31,10 no canal verde (FAM). Consulte Tabela 6.

Tabela 6. Intervalo C_T do FAM aceitável para reacção de controlo da amostra

Intervalo C_T do FAM aceitável para reacção de controlo da amostra		
Mistura de reacção	Canal	Intervalo C_T aceitável
Controlo	Verde (FAM)	23,70–31,10

Se a amostra estiver fora deste intervalo, é fornecido o seguinte guia.

- **C_T do ensaio de controlo de amostras < 23,70:** as amostras com um C_T de controlo < 23,70 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 > 31,10:** a amostra não contém ADN suficiente para permitir uma análise.

Desde que ambos os controlos de execução sejam válidos e o ensaio de controlo esteja dentro do intervalo estabelecido na Tabela 6, o valor de C_T de cada amostra deve estar dentro do intervalo apresentado na Tabela 7 no canal verde (FAM). Se a amostra estiver fora deste intervalo, é fornecido o seguinte guia.

Tabela 7. Valores aceitáveis de reacção de mutação de amostra

Valores aceitáveis de reacção de mutação de amostra			
Reacções	Mistura de reacção	Canal	Intervalo C_T
Reacção de mutação	T790M	Verde (FAM)	0,00–40,00
	Delecções	Verde (FAM)	0,00–40,00
	L858R	Verde (FAM)	0,00–40,00
	Todas as 3 mutações	Amarelo (HEX)	29,85–35,84

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 está entre 29,85 e 35,84:** não existe ADN de EGFR amplificável.
- **Valor de C_T do controlo interno não está dentro do intervalo de 29,85 a 35,84:** 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.

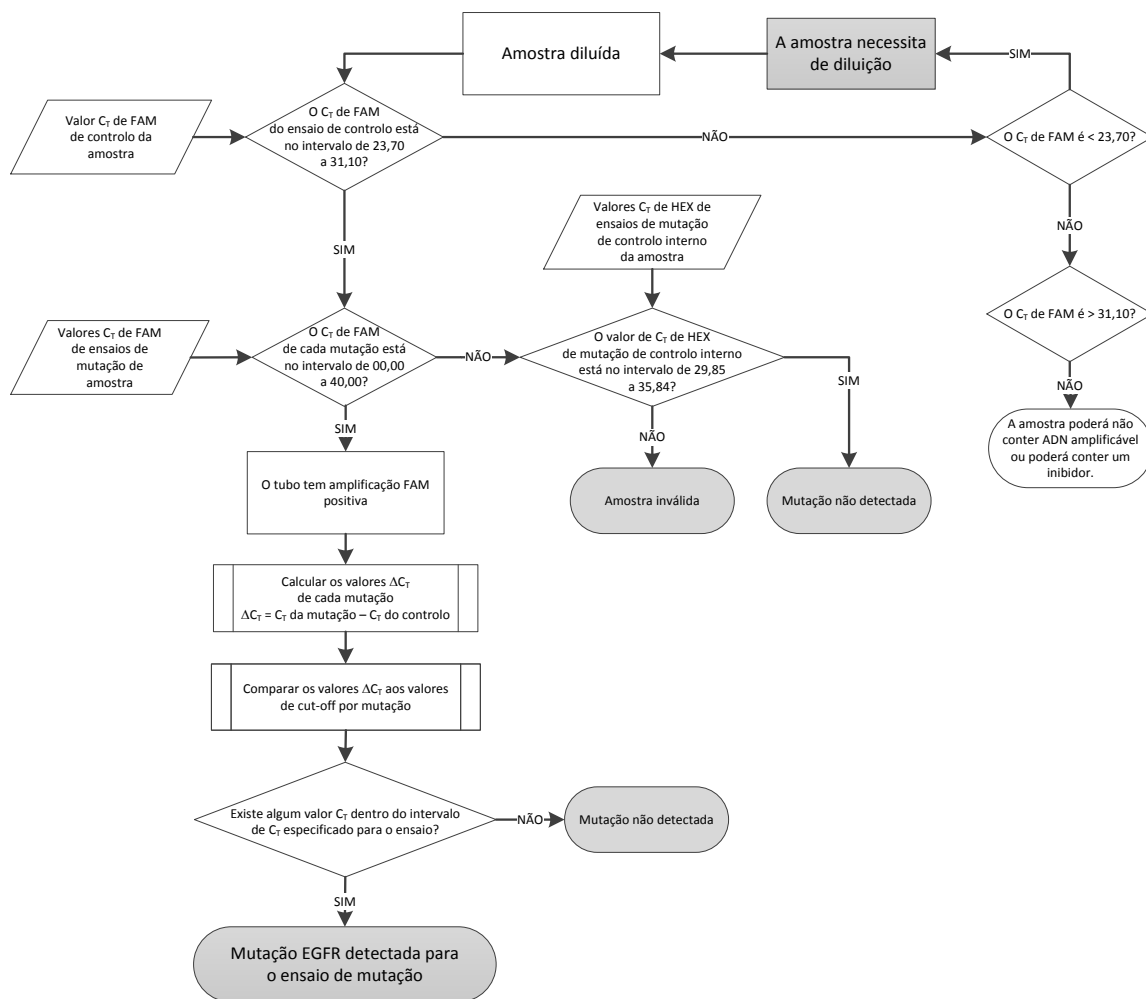


Figura 15. Diagrama de análise de mutação.

Valor C_T de FAM de ensaios de mutação de amostra

Os valores FAM de todas as três misturas de reacção de mutação deverão ser comparados aos valores apresentados na Tabela 7.

Calcule conforme se segue o valor ΔC_T de cada amostra de mutação que apresente amplificação positiva, certificando-se de que os 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 (consulte Tabela 8), certificando-se de que o ponto de cut-off correcto é aplicado a cada ensaio.

Tabela 8. Valores de cut-off do ensaio de mutação

Ensaio de mutação	Cut-offs de ΔC_T
T790M	$\leq 7,40$
Delecções	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$

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 29,85 e 35,84, nesse caso a mutação não é detectada. Se o valor do C_T HEX se encontrar fora deste intervalo, 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 é positiva e o valor de ΔC_T está acima do valor de cut-off e HEX (controlo interno) está entre 29,85 e 35,84.
A amplificação FAM é negativa e HEX (controlo interno) está entre 29,85 e 35,84.
- **Inválido:** amplificação FAM negativa e amplificação HEX fora das especificações.

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 conforme 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. |
| b) Programação incorrecta do perfil de temperatura do equipamento Rotor-Gene Q | 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 11) | Verifique as condições de armazenamento e a data do prazo de validade (ver o rótulo do kit) dos reagentes e, se necessário, utilize um novo kit. |

Comentários e sugestões

- e) O prazo de validade do Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR expirou
- Verifique as condições de armazenamento e a data do prazo de validade (ver o rótulo do kit) dos reagentes 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
- Repita a PCR com novos reagentes nas réplicas.
- Se possível, feche os tubos de PCR imediatamente depois de adicionar a amostra a testar.
- Certifique-se de que o local de trabalho e os equipamentos são descontaminados a intervalos regulares.

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 Plasma 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 todas as descobertas clínicas e laboratoriais relevantes e não deverão ser utilizados para diagnóstico sem outros dados.

O produto só deve ser utilizado por pessoal com especial formação e especialização em procedimentos de diagnóstico in vitro e no equipamento Rotor-Gene Q MDx.

Os estudos de validação analítica foram elaborados com ADN humano extraído de amostras de plasma.

O produto deve ser utilizado exclusivamente no ciclador PCR em tempo real do Rotor-Gene Q MDx.

Para a obtenção de resultados otimizados, é necessário o cumprimento estrito do manual do Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR. Não se recomenda a

diluição de reagentes não descritos neste manual pois pode resultar numa redução do seu desempenho.

Devem ser observados os prazos de validade e as condições de armazenamento impressas na caixa e nas etiquetas de todos os componentes. Não utilize componentes fora de prazo de validade ou armazenados de forma incorrecta.

Características de desempenho

Sensibilidade analítica – limite do branco (LOB)

Para avaliar o desempenho do Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR na ausência de modelo, e para assegurar que uma amostra em branco ou uma amostra com ADN de tipo selvagem não gera um sinal analítico que possa indicar uma baixa concentração de mutação, foi avaliado ADN de tipo selvagem de EGFR de plasma NSCLC de 59 amostras diferentes. Os critérios de aceitação do estudo (pelo menos 95% das amostras de tipo selvagem têm de ter um valor de ΔC_T acima do cut-off respectivo) foram cumpridos.

Limite de detecção (LOD)

O LOD é a percentagem mínima de ADN mutante que pode ser detectada num fundo de ADN de tipo selvagem quando o ADN amplificável total (dentro do intervalo de entrada) gerou 95% de determinações de mutação correctas para cada amostra de mutação positiva (C95). O intervalo de trabalho de entrada de ADN para o ensaio é definido pelo C_T de controlo no intervalo pré-especificado de 23,70 a 31,10.

O LOD foi determinado com níveis baixos de entrada de ADN (C_T de controlo aproximadamente 30,10) utilizando ADN derivado de tecido FFPE para o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. O LOD foi determinado utilizando amostras clínicas de FFPE e linha celular FFPE a níveis baixos de entrada de ADN para estas mutações do EGFR.

Os valores de LOD estabelecidos utilizando o tecido FFPE foram verificados para o Kit *therascreen* EGFR plasma RQG PCR com ADN derivado de amostras de plasma mutante positivas artificiais.

As pretensões finais de LOD listadas na Tabela 9 abaixo indicam a percentagem de mutações que obteve uma probabilidade prevista de determinações correctas de 95% para cada uma das mutações.

Tabela 9. LODs de cada um dos ensaios de mutação EGFR

Exão	Mutação	ID COSMIC*	Pretensão de % de LOD		
20	T790M	6240	17,5*		
		6223	6,4*		
		13551	4,24*		
		12728	2,43†		
		12419	16,87†		
		12422	3,24†		
		6218	9,83†		
		6210	7,44†		
		6254	10,2*		
		12370	8,1*		
		19	Delecções	12678	10,40†
				12367	4,39†
12384	7,54†				
6225	6,5*				
6220	2,7*				
6255	0,81*				
12382	1,45*				
12383	4,58*				
12387	4,91†				
12369	4,94*				
21	L858R	6224	5,94*		

* Pretensões de LOD verificadas em plasma como parte do estudo de confirmação de LOD do Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR.

† Estas mutações não foram confirmadas no plasma.

Sensibilidade analítica – cut-offs de ΔC_T

Foi feita uma abordagem em função dos riscos relativamente às taxas de falsos positivos ao definir os cut-offs do ensaio, e os valores estimados de LOB foram utilizados como um componente no desenvolvimento do valores de cut-off. Os cut-offs de ΔC_T respectivos de cada ensaio de mutação do Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR são fornecidos na Tabela 10.

Tabela 10. Cut-offs de ΔC_T do Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR

Ensaio de mutação	Cut-offs de ΔC_T
T790M	$\leq 7,40$
Delecção	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$

Repetibilidade e reprodutibilidade

A repetibilidade e a reprodutibilidade foram avaliadas testando o nível de mutação a $3 \times \text{LOD}$ 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 três ensaios de mutação, 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

Este estudo foi realizado utilizando ADN extraído de tecido FFPE. Para determinar o efeito de alterar a concentração do ADN de entrada nos resultados produzidos pelo Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR perto do LOD, foi desenvolvido um conjunto de amostras para todas as 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 (23,70 a 31,10).

Uma avaliação do conjunto de dados de entrada de ADN (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

Substâncias endógenas interferentes

As substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras de plasma mutante positivas artificiais a $3 \times \text{LOD}$. Em seguida, as amostras foram testadas com o Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR. As amostras com substâncias potencialmente interferentes foram comparadas com as amostras de plasma mutante positivas artificiais a $3 \times \text{LOD}$ sem substâncias interferentes. Cada substância interferente foi testada com 4 réplicas.

Uma diferença de mais de 2 desvios padrão (DP) (obtido do estudo de precisão) entre o ΔC_T do "teste" e do "controle" (ou seja., sem substância interferente) foi considerada como indicativa de uma potencial interferência. Nestas instâncias, é fornecida a diferença de ΔC_T observada.

As concentrações do teste fornecidas na Tabela 11 foram seleccionadas com base em orientações fornecidas na *directriz EPO7-A2 do CLSI* e são representativas das concentrações máximas esperadas numa amostra clínica.

Nota: estes compostos endógenos foram adicionadas a amostras de plasma mutante positivas artificiais que incluíam plasma de doadores saudáveis. Por conseguinte, estes compostos endógenos estariam naturalmente presentes nas amostras em concentrações desconhecidas antes da adição. A concentração final de cada substância endógena potencialmente interferente seria provavelmente maior do que a concentração do teste.

Tabela 11. Substâncias endógenas potencialmente interferentes

Substâncias potencialmente interferentes (SI)	Concentração do teste
Bilirrubina não conjugada	150 mg/dl
Hemoglobina (humana)	2 g/dl
Triglicéridos	3 g/dl

Ensaio T790M

Demonstrou-se que os seguintes compostos endógenos com as concentrações estabelecidas na Tabela 11 tiveram um efeito superior a 2 DP (0,40 ΔC_T) no desempenho do ensaio T790M:

- Triglicéridos, diferença de 1,37 ΔC_T

Ensaio de deleções

Demonstrou-se que os seguintes compostos endógenos com as concentrações estabelecidas na Tabela 11 tiveram um efeito superior a 2 DP (0,71 ΔC_T) no desempenho do ensaio de deleções:

- Hemoglobina, diferença de 0,80 ΔC_T

Ensaio L858R

Demonstrou-se que os seguintes compostos endógenos com as concentrações estabelecidas na Tabela 11 tiveram um efeito superior a 2 DP (0,56 ΔC_T) no desempenho do ensaio L858R:

- Bilirrubina, diferença de 1,13 ΔC_T
- Triglicéridos, diferença de 1,53 ΔC_T

Substâncias exógenas interferentes

As substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras de plasma mutante positivas artificiais a 3 × LOD. Em seguida, as amostras foram testadas com o Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR. As amostras com substâncias potencialmente interferentes foram comparadas com as amostras de plasma mutante positivas artificiais a 3 × LOD sem substâncias interferentes. Cada substância interferente foi testada com 4 réplicas.

Uma diferença de mais de 2 desvios padrão (obtido do estudo de precisão) entre o ΔC_T do "teste" e o ΔC_T do "controlo" (ou seja., sem substância interferente) foi considerada como indicativa de uma potencial interferência. Nestas instâncias, é fornecida a diferença de ΔC_T observada.

As concentrações do teste fornecidas na Tabela 12 foram seleccionadas com base em orientações fornecidas na *directriz EPO7-A2 do CLSI* e excedem a concentração terapêutica em todos os casos.

Tabela 12. Substâncias exógenas potencialmente interferentes

Substâncias potencialmente interferentes (SI)	Concentração do teste (µg/ml)
Bromidrato de citalopram	0,75
Cloridrato de paroxetina hemi-hidratado	1,14
Cloridrato de sertralina	0,67
Cloridrato de fluoxetina	3,87
Paracetamol	200,7
K2 EDTA	3600

Ensaio T790M

Demonstrou-se que os seguintes compostos exógenos com as concentrações estabelecidas na Tabela 12 tiveram um efeito superior a 2 DP (0,40 ΔC_T) no desempenho do ensaio T790M:

- Bromidrato de citalopram, diferença de 0,52 ΔC_T
- Cloridrato de sertralina, diferença de 0,47 ΔC_T
- Cloridrato de fluoxetina, diferença de 0,48 ΔC_T

Ensaio de deleções

Demonstrou-se que os seguintes compostos exógenos com as concentrações estabelecidas na Tabela 12 tiveram um efeito superior a 2 DP (0,71 ΔC_T) no desempenho do ensaio de deleções:

- Fluoxetina, diferença de 0,73 ΔC_T

Ensaio L858R

Demonstrou-se que os seguintes compostos exógenos com as concentrações estabelecidas na Tabela 12 tiveram um efeito superior a 2 DP (0,56 ΔC_T) no desempenho do ensaio L858R:

- Bromidrato de citalopram, diferença de 0,72 ΔC_T
- Cloridrato de paroxetina hemi-hidratado, diferença de 0,92 ΔC_T
- Cloridrato de sertralina, diferença de 0,82 ΔC_T
- Cloridrato de fluoxetina, diferença de 0,98 ΔC_T
- Paracetamol, diferença de 0,81 ΔC_T
- K2 EDTA, diferença de 0,57 ΔC_T

Desempenho clínico

O ensaio clínico NCT01203917 foi um estudo de segmento único aberto de fase IV para avaliar a eficácia e a segurança/tolerabilidade de gefitinib de primeira linha em pacientes caucasianos com NSCLC de estágio IIIA/B/IV com mutação positiva de EGFR.

A elegibilidade dos pacientes para participação no ensaio clínico NCT01203917 foi determinada pela presença de mutações sensíveis a EGFR. O estado de mutação de EGFR de pacientes com NSCLC foi avaliado utilizando a análise para clínico (CTA), com ADN de amostras de tecido e plasma coincidentes. O estudo abrangeu um objectivo exploratório de biomarcadores planeado previamente para estabelecer se as amostras de plasma podem ser consideradas para análise de mutação caso as amostras de tecido estejam indisponíveis. Os resultados demonstraram elevadas taxas de concordância entre as amostras coincidentes de tecido e de plasma a 94,3%, com especificidade do ensaio de 99,8% e sensibilidade de 65,7%.¹















Os testes retrospectivos de amostras de plasma de pacientes examinados para o ensaio clínico NCT01203917 foram efectuados utilizando o Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR. Foi realizado um estudo comparativo para avaliar a concordância do Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR com a CTA utilizada para seleccionar pacientes para o ensaio clínico NCT01203917. Foi demonstrada a equivalência entre a CTA e o Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR.

Referências

1. Douillard, J.Y., et al. (2014). First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 110(1), 55.

Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer na embalagem e nas etiquetas:

	Contém reagentes suficientes para <N> testes
	Prazo de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Ref. ^ª
	Número de lote
	Número do material
	Componentes
	Conteúdo
	Número
	Global Trade Item Number
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consultar instruções de utilização
	Atenção

Informações de contacto

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

Anexo A: Pormenores das mutações

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

Tabela 13. Lista de mutações e IDs COSMIC.

Mutação	Exão	Mudança de base	ID COSMIC
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
		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
Delecções	19	2238_2252>GCA (complexo)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		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	Índice	Ref.ª
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacções: 1 ensaio de controlo, 7 ensaios de mutação, controlo positivo, polimerase <i>Taq</i> do ADN	870311
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

Produto	Índice	Ref.º
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
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloco de alumínio para a preparação manual da reacção 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
Produtos relacionados		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Para 50 preparações: colunas QIAamp mini, extensões para tubos (20 ml), QIAGEN Proteinase K, ARN transportador, tampões, conectores de vácuo e tubos de colheita sanguínea (1,5 ml e 2 ml)	55114

Esta página foi deixada intencionalmente em branco.

Marcas registadas: QIAGEN®, *therascreen*®, Rotor-Gene®, Pyro®, ARMS®, Scorpions®, Taq® (Grupo QIAGEN); IRESSA® (Grupo AstraZeneca).

Acordo de licenciamento limitado para o Kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

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 otimizados 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 infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados nem ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda 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.

Dez-14 HB-1898 © 2014 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

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

