

Janeiro de 2019

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



Versão 2



Para uso em diagnóstico *in vitro*

Para utilização com os equipamentos Rotor-Gene[®] Q MDx



874111



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, ALEMANHA



1116287PTBR





Conteúdo

Uso previsto	6
Resumo e explicação	7
Princípio do procedimento	9
Materiais fornecidos	14
Conteúdo do kit	14
Materiais necessários mas não fornecidos	15
Avisos e precauções	17
Precauções gerais	17
Armazenamento e manuseio de reagentes	19
Condições de transporte	19
Condições de armazenamento.....	19
Armazenamento e manuseio de amostras.....	20
Procedimento	21
Extração e preparação de DNA	21
Protocolo: Avaliação de amostras	22
Protocolo: Detecção de mutações EGFR	35
Interpretação de resultados (Automatizados).....	48
Alarmes do Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package.....	49
Guia de solução de problemas	54
Controle de qualidade	55
Limitações.....	55
Características de desempenho.....	56

Desempenho analítico.....	56
Limite do branco (LOB) faixa de trabalho e valores de cut-off	56
Efeito da entrada de DNA em valores ΔC_T	57
Reatividade cruzada.....	58
Exatidão: Comparação com o método de referência analítica.....	58
Valores de limite de detecção (LOD)	59
Interferência.....	61
Reprodutibilidade	61
Desempenho clínico	64
Dados de resultados clínicos: GIOTRIF®	64
Dados de resultados clínicos: IRESSA®	66
Referências	69
Símbolos	71
Anexo A: Protocolo do Manual do Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR	72
Informações gerais	72
Protocolo: Criar um perfil de temperatura	72
Procedimento (Manual)	83
Protocolo: Avaliação de amostras (manual)	83
Protocolo: Detecção de mutações EGFR (manual)	83
Protocolo: Configuração Rotor-Gene Q do Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR	84
Interpretação de resultados (Manual)	89
Configurações de análise do software	89
Análise de dados de avaliação de amostras	90
Análise de dados de detecção de mutação EGFR	92

Anexo B: Instalação do <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package.....	100
Informações de contato	103
Informações para pedidos	104
Histórico de revisão do Manual.....	106

Uso previsto

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR é um teste de diagnóstico in vitro para detectar 29 mutações somáticas no gene EGFR. Fornece uma avaliação qualitativa do estado da mutação em amostras de tumores de pacientes com carcinoma de pulmão de células não pequenas (non-small cell lung cancer, NSCLC).

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

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR é utilizado para testar amostras de DNA extraídas de tecido tumoral fixado em formalina e conservado em parafina (formalin-fixed, paraffin embedded, FFPE) de pacientes com NSCLC, e executadas em um equipamento Rotor-Gene Q MDx. O kit deve ser utilizado por pessoal devidamente treinado, em um ambiente de laboratório profissional.

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

Resumo e explicação

Os cânceres humanos apresentam frequentemente mutações do oncogene EGFR (1, 2). A presença destas mutações é correlacionada à reação a certas terapias de inibidores da tirosina quinase (tyrosine kinase inhibitor, TKI) nos pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) (3–8). Estas mutações no oncogene EGFR estão presentes na população geral de pacientes com NSCLC com uma frequência de aproximadamente 10% nos pacientes dos EUA, Europa e Austrália e de até 30% nos pacientes do Japão e Taiwan (1, 2, 9).

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR é um kit pronto para ser usado para a detecção de 29 mutações no gene EGFR relacionado ao câncer, utilizando reação de polimerização em cadeia (polymerase chain reaction, PCR) em um equipamento Rotor-Gene Q MDx.

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

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

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

Tabela 1. Lista de mutações e identificações COSMIC

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

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

Continuação da Tabela 1. Lista de mutações e identificações COSMIC

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

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

Princípio do procedimento

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

ARMS

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

Scorpions

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

Formato do Kit

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

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

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

Ensaio

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR compreende um procedimento de dois passos. No primeiro passo, o ensaio de controle é efetuado para avaliar o DNA total amplificável de EGFR em uma amostra. No segundo passo, os ensaios de mutação e de controle são ambos efetuados para determinar a presença ou ausência de DNA mutante.

Ensaio de controle

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

Ensaaios de mutação

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

Controles

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

Controle positivo

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

Controle negativo

Cada execução deve conter um controle negativo ("controle sem modelo": NTC) nos tubos 9 a 16. O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR contém água para o NTC para utilizar como o "modelo" do "controle sem modelo". O controle sem modelo é utilizado para avaliar qualquer potencial contaminação durante a configuração da execução e para avaliar o desempenho da reação do controle interno.

Avaliação da reação do controle interno

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

Avaliação de amostras

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

Nota: a avaliação do DNA deve basear-se na PCR e poderá diferir da quantificação baseada em leituras de absorção. Mistura de Reação de Controle (tubo CTRL) suplementar é fornecida para permitir a avaliação da qualidade e quantidade do DNA nas amostras antes da análise com o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Plataforma e software

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR foi concebido especificamente para uso com equipamentos Rotor-Gene Q MDx. O equipamento Rotor-Gene Q MDx é programado para diferentes parâmetros de ciclagem, ou “execuções”, pelo *therascreen* EGFR CE Assay Package.

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

Também é possível utilizar o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR com o software Rotor-Gene Q versão 2.3 no modo aberto (ou seja, sem utilizar o Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Para os detalhes, veja “Anexo A: Protocolo do Manual do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR”, na página 72.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

therascreen EGFR RGQ PCR Kit				(24)
N.º de Ref.º				874111
Número de reações				24
Cor	Identidade	ID do tubo		Volume
Vermelho	Control Reaction Mix (Mistura de reação de controle)	1	CTRL	2 × 600 µL
Roxo	T790M Reaction Mix (Mistura de reação de T790M)	2	T790M	600 µL
Laranja	Deletions Reaction Mix (Mistura de reação de deleções)	3	Del	600 µL
Rosa	L858R Reaction Mix (Mistura de reação de L858R)	4	L858R	600 µL
Verde	L861Q Reaction Mix (Mistura de reação de L861Q)	5	L861Q	600 µL
Amarelo	G719X Reaction Mix (Mistura de reação de G719X)	6	G719X	600 µL
Cinza	S768I Reaction Mix (Mistura de reação de S768I)	7	S768I	600 µL
Azul	Insertions Reaction Mix (Mistura de reação de inserções)	8	Ins	600 µL
Bege	EGFR Positive Control (Controle Positivo do EGFR)	9	PC	300 µL
Verde-menta	Taq DNA Polymerase (Polimerase Taq de DNA)	Taq	2 × 80 µL	2 × 80 µL
Branco	Água isenta de nuclease para controle sem modelo	NTC	1,9 mL	1,9 mL
Branco	Água isenta de nuclease para dilução	Dil.	1,9 mL	1,9 mL
therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook (Manual do Kit therascreen EGFR RGQ PCR)				1

Materiais necessários mas não fornecidos

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (safety data sheets, SDSs) disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Reagentes

- Kit de extração de DNA (veja “Extração e preparação de DNA”, na página 21)

Consumíveis e equipamento geral de laboratório

- Pipetas* de uso exclusivo (ajustáveis) para o preparo de amostras
- Pipetas* de uso exclusivo (ajustáveis) para o preparo de mistura principal de PCR
- Pipetas* de uso exclusivo (ajustáveis) para dispensar o DNA do modelo
- Ponteiras de pipeta isentas de DNase, RNase e DNA com filtros (para evitar contaminação cruzada, é recomendável o uso de ponteiras de pipeta com barreira contra aerossol)
- Tubos de tiras e tampas, 0,1 mL, para uso com rotor de 72 poços (n° de ref.º 981103 ou 981106)
- Tubos de microcentrifugação isentos de DNase RNase e DNA para o preparo de misturas principais
- 72 tubos de 0,1 mL para bloco de carregamento, bloco de alumínio para a configuração de reação manual com uma pipeta de canal único (n° de ref.º 9018901)
- Termo-misturador*, incubadora orbital aquecida*, bloco de aquecimento* ou banho-maria* com capacidade de incubação a 90°C
- Centrífuga de bancada* com rotor para tubos de reação de 2 mL
- Agitador vórtex*

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

Equipamento para PCR

- Equipamento Rotor-Gene Q MDx com canais de fluorescência para Ciclagem verde e Ciclagem amarela (detecção de FAM e HEX, respectivamente)*†
- Software do Rotor-Gene Q, versão 2.3
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package CD, versão 3.0.5 (nº de ref.º 9023537)

Nota: O software do Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package precisa do software Rotor-Gene Q versão 2.3.

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

† Em alguns países, se aplicável, um equipamento Rotor-Gene Q 5plex HRM com data de produção de maio de 2011 ou posterior pode ser utilizado. A data de fabricação pode ser consultada pelo número de série na parte traseira do instrumento. O número de série está no formato “mmaannn”, em que “mm” indica o mês de produção, “aa” indica os últimos dois algarismos do ano de produção e “nnn” indica o identificador exclusivo do equipamento.

Avisos e precauções

Para uso em diagnóstico *in vitro*

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

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

Elimine as amostras e os resíduos dos ensaios de acordo com os regulamentos de segurança locais.

Precauções gerais

Observe sempre o seguinte.

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

- Todos os produtos químicos e materiais biológicos são potencialmente perigosos. As amostras são potencialmente infecciosas e devem ser tratadas como materiais com risco biológico.
- Os reagentes para o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR foram diluídos a uma concentração otimizada. Não dilua mais os reagentes, pois poderia diminuir o seu desempenho. Não utilize volumes de reação (mistura de reação e amostra) inferiores a 25 µL, pois isso aumentaria o risco de falsos negativos.
- Todos os reagentes fornecidos no Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR destinam-se a ser utilizados unicamente com os outros reagentes fornecidos no mesmo Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Não substitua os reagentes do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ou troque entre kits *therascreen* EGFR RGQ PCR, pois isso poderia afetar o desempenho.
- Utilize somente a polimerase *Taq* de DNA (*Taq*) fornecida no Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Não substitua por polimerase *Taq* de DNA de outros kits do mesmo tipo ou de qualquer outro tipo, ou por polimerase *Taq* de DNA de outro fornecedor.
- Não utilize componentes cuja data de validade tenha expirado ou que tenham sido incorretamente armazenados.

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

Nota: os reagentes estão validados para configuração manual. Se um método automático for utilizado, o número de reações possíveis poderá diminuir, devido ao reagente necessário para preencher os “volumes mortos” nesses equipamentos.

Armazenamento e manuseio de reagentes

Condições de transporte

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

Condições de armazenamento

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR deve ser armazenado imediatamente após ser recebido, a uma temperatura entre -30 e -15 °C, em um congelador de temperatura constante e protegido da luz. As moléculas Scorpions (tal como todas as moléculas rotuladas com fluorescência) devem estar sempre protegidas da luz para evitar a sua foto-descoloração e a diminuição do desempenho. Quando armazenado nas condições de armazenamento recomendadas e na embalagem original, o kit permanecerá estável até a data de validade impressa no rótulo. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento sucessivos. É recomendável 8 ciclos de congelamento/descongelamento, no máximo.

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

- 6 horas se armazenado à temperatura ambiente

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

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

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

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

Nota: para uma utilização otimizada dos reagentes do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, as amostras devem ser divididas em lotes. Se as amostras forem testadas individualmente, mais reagentes serão utilizados e diminuirá o número de amostras que podem ser testadas com o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Armazenamento e manuseio de amostras

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

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

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

Para preparar amostras de tecido para extração de DNA:

- Usando materiais e métodos padrão, fixe a amostra de tecido em formol neutro tamponado a 10% (FNT) e embeba a amostra de tecido em parafina. Usando um micrótomo, faça cortes em série de 5 µm no bloco de parafina e coloque-os em lâminas de vidro.

- Alguém habilitado (por ex., um patologista) deve avaliar um corte com coloração Hematoxilina-Eosina (H&E) para confirmar a presença de tumor.
- Os cortes com coloração não devem ser utilizados para extração de DNA.
- Armazene todas as lâminas e blocos FFPE à temperatura ambiente (15 a 25 °C).
As lâminas podem ser armazenadas à temperatura ambiente por até 1 mês antes da extração do DNA.

Procedimento

Extração e preparação de DNA

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

- Não utilize solução de desparafinização QIAGEN. Utilize somente o método de xileno/etanol de desparafinização, descrito no *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* (Manual de Instruções do Kit QIAamp DNA FFPE Tissue).
- É importante utilizar somente etanol de qualidade para biologia molecular* em todos os passos necessários.
- Raspe a área inteira do tecido de dois cortes em um tubo de microcentrifugação rotulado, utilizando um bisturi novo para cada amostra.
- A digestão com proteinase K (passo 11 no *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) (Manual de Instruções do kit QIAamp DNA FFPE Tissue) deve ser efetuada durante 1 hora \pm 5 minutos, a 56°C \pm 3°C.

* Não se deve utilizar álcool desnaturado, pois ele contém outras substâncias como o metanol ou o metil-etil-cetona.

- A digestão com proteinase K (passo 12 no *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) (Manual de Instruções do kit QIAamp DNA FFPE Tissue) deve ser efetuada durante 1 hora \pm 5 minutos, a 90°C \pm 3°C.
- Não utilize o passo de RNase descrito no *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* (Manual de Instruções do kit QIAamp DNA FFPE Tissue).
- As amostras devem ser eluídas com 120 μ L de tampão de eluição (ATE) do kit QIAamp DNA FFPE Tissue [passo 20 no *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* (Manual de Instruções do kit QIAamp DNA FFPE Tissue)].
- O DNA genômico pode ser armazenado entre 2 e 8°C por 1 semana após a extração, ou entre -30 e -15°C por até 8 semanas antes de ser utilizado.

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 DNA altamente fragmentado.

Protocolo: Avaliação de amostras

Este protocolo é utilizado para avaliar o DNA total amplificável em amostras utilizando o “*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template” do Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package para avaliação automática de amostras.

Nota: para avaliação manual de amostras de DNA, veja “Anexo A: Protocolo do Manual do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR”, na página 72.

Pontos importantes antes de iniciar

- Antes de iniciar o procedimento, leia “Precauções gerais”, na página 17.
- É conveniente que você se familiarize com o equipamento Rotor-Gene Q MDx antes de iniciar o protocolo. Consulte o manual do usuário do equipamento.
- Não misture com agitação forte a *Taq* ou qualquer mistura que contenha *Taq*, pois isso poderia inativar a enzima.

- Pipete a *Taq* colocando a ponteira da pipeta ligeiramente abaixo da superfície do líquido para evitar que a ponteira seja revestida com excesso de enzima.
- Até 24 amostras podem ser avaliadas utilizando a mistura de reação de controle disponível.

○ que fazer antes de iniciar

- Certifique-se de que o software do *therascreen* EGFR CE Assay Package está instalado antes de utilizar o equipamento Rotor-Gene Q MDx pela primeira vez (veja “Anexo B: Instalação do *therascreen* EGFR CE Assay Package”, na página 100).
- Antes de cada utilização, todos os reagentes devem ser completamente descongelados por pelo menos 1 hora e por 4,5 horas, no máximo, à temperatura ambiente (15 a 25 °C), misturados invertendo 10 vezes e centrifugados com brevidade para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Misture todas as amostras invertendo 10 vezes, e centrifugue com brevidade para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Certifique-se de que a *Taq* está à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de cada utilização. Efetue uma breve centrifugação do tubo para coletar a enzima no fundo do tubo.

Procedimento

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

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

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

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

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

Nota: a *Taq* deve ser trazida para a temperatura ambiente (15 a 25 °C) ao mesmo tempo que os outros reagentes (veja “Armazenamento e manuseio de reagentes”, na página 19). Efetue uma breve centrifugação do tubo para coletar a enzima no fundo do tubo.

- Quando os reagentes estiverem descongelados, misture-os invertendo cada tubo 10 vezes para evitar concentrações localizadas de sais e, em seguida, efetue uma breve centrifugação para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Prepare misturas principais de controle (Mistura de reação de controle [CTRL] mais *Taq*) que sejam suficientes para as amostras de DNA, uma reação de Controle Positivo (PC) do EGFR e uma reação de controle sem modelo (NTC), de acordo com os volumes exibidos na Tabela 3. Inclua reagentes para 1 amostra suplementar para permitir uma quantidade extra suficiente para o preparo da PCR.

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

Tabela 3. Preparo da mistura principal do ensaio de controle

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

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

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

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

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

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

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

5. Adicione imediatamente 5 µL de água para NTC ao tubo na posição 2 e coloque a tampa no tubo.
6. Adicione 5 µL de cada amostra aos tubos de amostra (posições de tubo 3 a 26) e coloque as tampas nos tubos.
7. Adicione 5 µL de PC do EGFR ao tubo na posição 1 e coloque a tampa no tubo.
- Tome cuidado para evitar erros de carregamento ou de pipetagem, para garantir a adição correta de NTC, de amostras e de PC nos tubos adequados. Marque as tampas dos tubos para indicar a direção de carregamento dos tubos no equipamento Rotor-Gene Q MDx.

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

Se o rotor não ficar totalmente ocupado, preencha todas as posições vazias do rotor com tubos vazios tampados.
11. Coloque imediatamente o rotor de 72 poços no equipamento Rotor-Gene Q MDx. Certifique-se de que o anel de travamento (acessório do equipamento Rotor-Gene Q MDx) é colocado por cima do rotor para prender os tubos durante a execução.

Nota: para avaliação manual de amostras, veja “Anexo A: Protocolo do Manual do Kit therascreen EGFR RGQ PCR”, na página 72.
12. Inicie o software Rotor-Gene Q clicando duas vezes no ícone “therascreen EGFR CE Control Run Locked Template” da área de trabalho do computador conectado ao equipamento Rotor-Gene Q MDx (Figura 1).



Figura 1. Ícone EGFR CE Locked Template para a execução de controle (avaliação de amostras).

13. A guia “Setup” (Configuração) é exibida por padrão (Figura 2). Certifique-se de que o anel de travamento está anexado corretamente e marque a caixa “Locking Ring Attached” (Anel de travamento anexado). Feche a tampa do equipamento Rotor-Gene Q MDx.

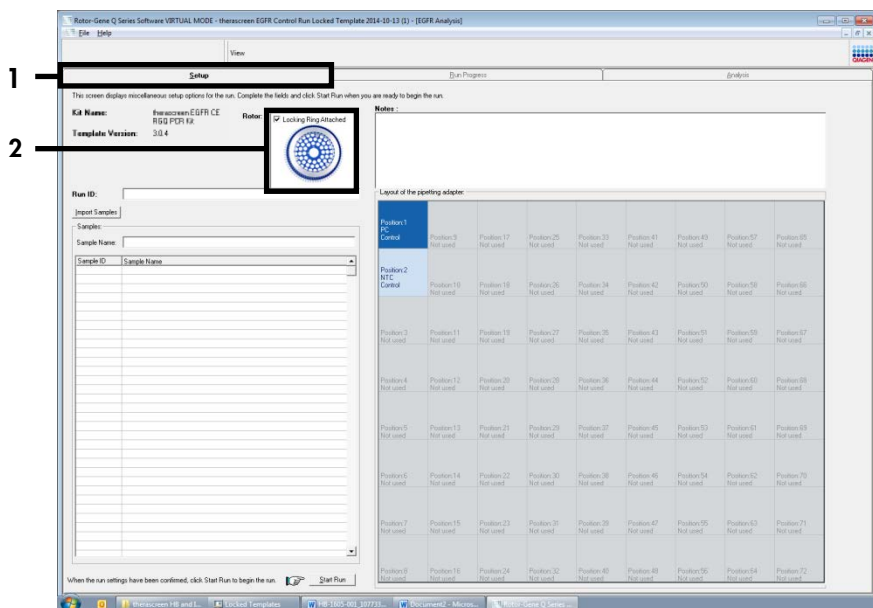


Figura 2. A guia “Setup” (Configuração) (1) e a caixa “Locking Ring Attached” (Anel de travamento anexado) (2).

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

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

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

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

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

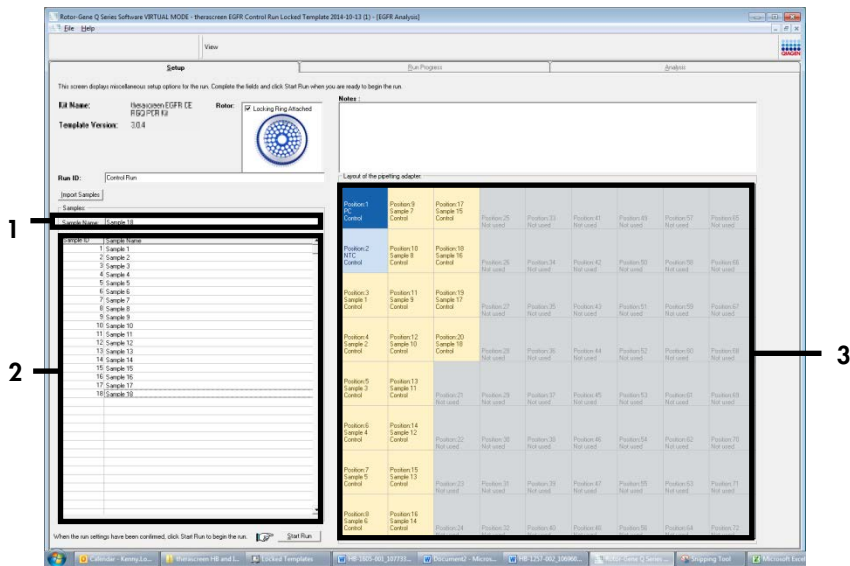


Figura 4. Inserção de nomes de amostras adicionais no campo de diálogo “Sample Name” (Nome da amostra). 1 = campo de diálogo “Sample Name” (Nome da amostra); 2 = “Sample List” (lista de amostras); 3 = painel “Layout of the pipetting adapter” (Configuração do adaptador de pipetagem).

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

Nota: se alguma posição do rotor não for usada, será exibida uma “Warning” (Advertência) (Figura 5), para lembrar ao usuário que todas as posições não utilizadas do rotor devem ser ocupadas por tubos vazios tampados. Certifique-se de que todas as posições não usadas do rotor estão ocupadas com tubos vazios tampados, e clique em “OK” para continuar.

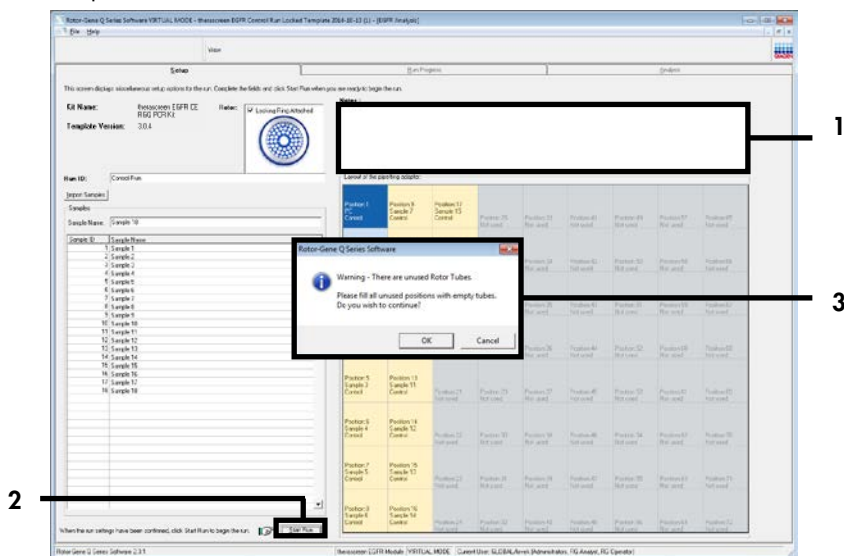


Figura 5. Campo de diálogo “Notes” (Notas) (1), botão “Start Run” (Iniciar execução) (2) e “Warning” (Advertência) das posições não usadas do rotor (3).

17. A janela “Save As” (Salvar como) é exibida. Escolha um nome de arquivo adequado e guarde a execução da PCR como um arquivo de execução *.rex na localização selecionada. Clique em “Save” (Salvar) (Figura 6).

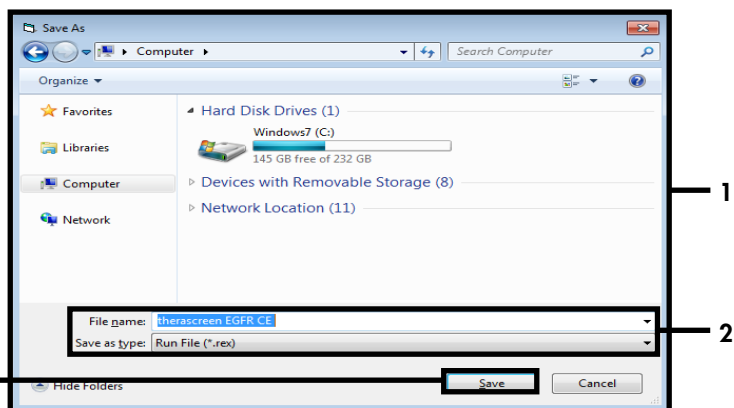


Figura 6. Janela “Save As” (Salvar como) (1). 2 = campos “File Name” (Nome do arquivo) e “Save as type” (Salvar como tipo); 3 = “Save” (Salvar).

18.A execução da PCR inicia-se.

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

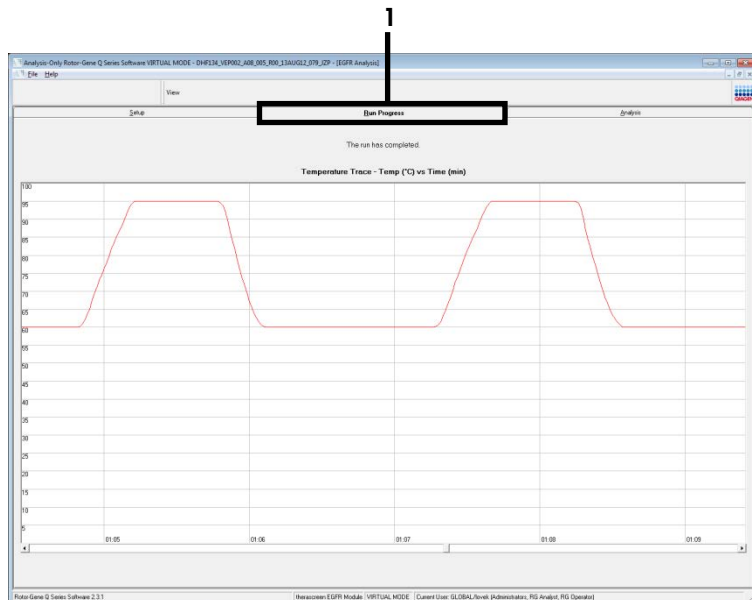


Figura 7. “A guia “Run Progress” (Evolução da execução) (1).

19.Quando a execução termina, a guia “Analysis” (Análise) abre.

Nota: se a guia “Analysis” (Análise) não abrir, clique na guia “Analysis” (Figura 8).

Nota: uma explicação do método de cálculo é exibida na seção “Interpretação de resultados (Automatizados)”, página 48.

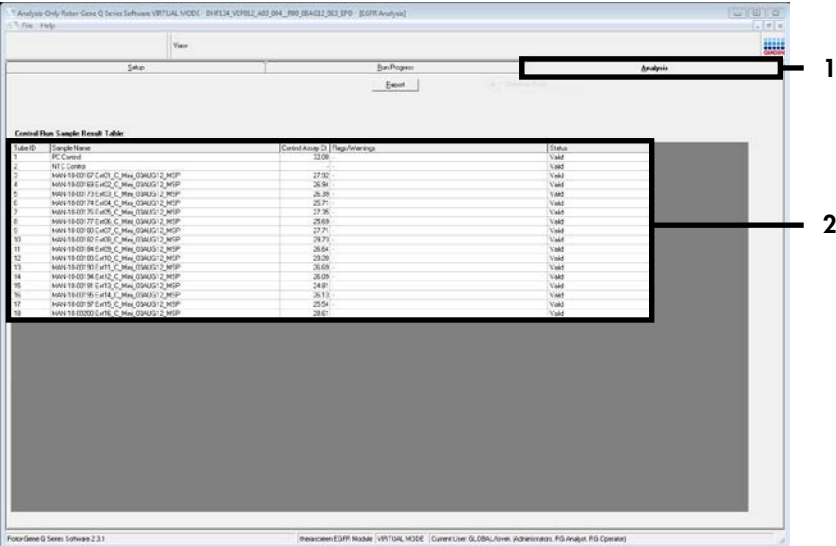


Figura 8. “A guia “Analysis” (Análise) (1) e a exibição de resultados [2 = “Sample QC Result Table” (Tabela de resultados de CQ de amostras)].

20.Os resultados de controles serão apresentados da seguinte forma na “Sample QC Result Table” (Tabela de resultados de CQ de amostras) (Figura 8).

Controles da execução (PC e NTC, respectivamente nas posições de tubo 1 e 2). Se os resultados se encontrarem dentro das faixas aceitáveis, cada um exibirá um “Valid” (Válido). Caso contrário, um resultado “Invalid” (Inválido) é exibido.

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

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

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

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

21. Clique em “Report” (Relatório) para criar um arquivo de relatório. A janela “Report Browser” (Navegador de relatórios) será exibida. Selecione “EGFR CE Analysis Report” (Relatório de análise EGFR CE) em “Templates” (Modelos), e depois clique em “Show” (Mostrar) (Figura 9).

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

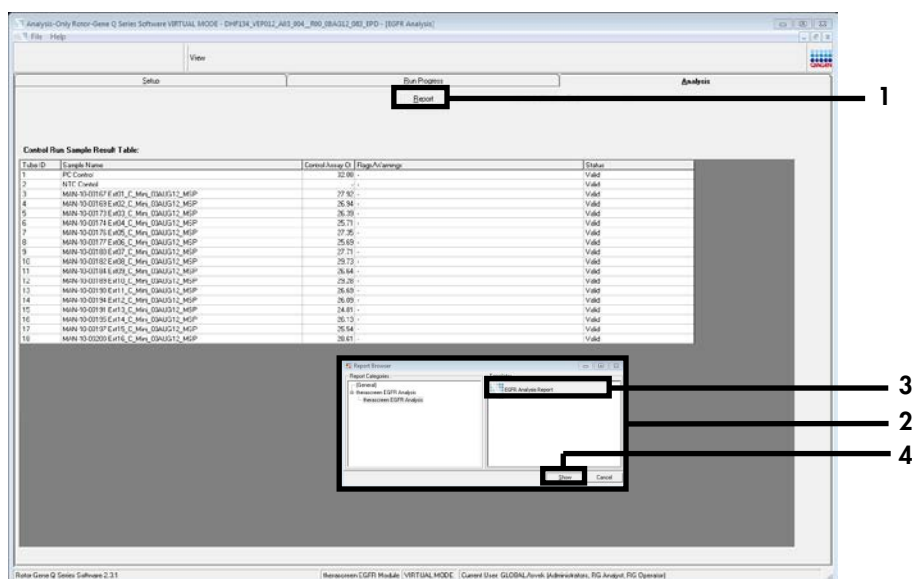


Figura 9. Seleção de “EGFR CE Analysis Report” (Relatório de análise EGFR CE). 1 = Report” (Relatório); 2 = janela “Report Browser” (Navegador de relatórios); 3 = seleção “EGFR Analysis Report” (Relatório de análise EGFR); 4 = “Show” (Mostrar).

Protocolo: Detecção de mutações EGFR

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

Nota: para a detecção manual de mutações, veja “Anexo A: Protocolo do Manual do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR”, na página 72.

Pontos importantes antes de iniciar

- Antes de iniciar o procedimento, leia “Precauções gerais”, na página 17.
- É conveniente que você se familiarize com o equipamento Rotor-Gene Q MDx antes de iniciar o protocolo. Consulte o manual do usuário do equipamento.
- Depois de ter passado o processo de avaliação de amostras de DNA, uma amostra pode ser testada utilizando os ensaios de mutação EGFR.
- Para uma utilização eficiente do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, as amostras devem ser agrupadas em lotes de sete. A utilização de lotes menores significa que menos amostras podem ser testadas com o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Uma amostra pode ser testada utilizando todas as misturas de reação fornecidas no Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Não misture com agitação forte a *Taq* ou qualquer mistura que contenha *Taq*, pois isso poderia inativar a enzima.
- Pipete cuidadosamente a *Taq* colocando a ponteira da pipeta ligeiramente abaixo da superfície do líquido para evitar que a ponteira seja revestida com excesso de enzima.

O que fazer antes de iniciar

- Certifique-se de que o software do *therascreen* EGFR CE Assay Package está instalado antes de utilizar o equipamento Rotor-Gene Q MDx pela primeira vez (veja “Anexo B: Instalação do *therascreen* EGFR CE Assay Package”, na página 100).

- Antes de cada utilização, todos os reagentes devem ser completamente descongelados por pelo menos 1 hora e por 4,5 horas, no máximo, à temperatura ambiente (15 a 25 °C), misturados invertendo 10 vezes e centrifugados com brevidade para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Misture todas as amostras invertendo 10 vezes, e centrifugue com brevidade para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
- Certifique-se de que a *Taq* está à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de cada utilização. Efetue uma breve centrifugação do tubo para coletar a enzima no fundo do tubo.

Procedimento

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

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

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

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

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

Nota: a *Taq* (*Taq* em tubo) deve ser trazida para a temperatura ambiente (15 a 25 °C) ao mesmo tempo que os outros reagentes (veja “Armazenamento e manuseio de reagentes”, na página 19). Efetue uma breve centrifugação do tubo para coletar a enzima no fundo do tubo.

2. Quando os reagentes estiverem descongelados, misture-os invertendo cada tubo 10 vezes para evitar concentrações localizadas de sais e, em seguida, efetue uma breve centrifugação para coletar o conteúdo no fundo do tubo.
3. Prepare misturas principais de ensaio (mistura de reação de ensaio mais *Taq*) que sejam suficientes para as amostras de DNA, um PC do EGFR e uma reação de NTC, de acordo com os volumes exibidos na Tabela 6. Inclua reagentes para 1 amostra suplementar para permitir uma quantidade extra suficiente para o preparo da PCR. As misturas principais contêm todos os componentes necessários para a PCR, exceto a amostra.

Tabela 6. Preparo das misturas principais de ensaio

Ensaio	Tubo de mistura de reação	Volume da mistura de reação	Volume da polimerase <i>Taq</i> de DNA (<i>Taq</i> em tubo)
Controle	CTRL	$19,5 \mu\text{L} \times (n + 1)^*$	$0,5 \mu\text{L} \times (n + 1)^*$
T790M	T790M	$19,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$
Deleções	Del	$19,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$
L858R	L858R	$19,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$
L861Q	L861Q	$19,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$
G719X	G719X	$19,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$
S768I	S768I	$19,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$
Inserções	Ins	$19,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{L} \times (n + 1)$

* n = número de reações (amostras e controles). Prepare mistura principal suficiente para uma amostra suplementar ($n + 1$) para garantir quantidade extra suficiente para o preparo da PCR. O valor n não deve exceder 7 (com controles), já que 7 é o número máximo de amostras que podem ser incluídas em uma execução.

4. Misture muito bem as misturas principais de ensaio, pipetando suavemente para cima e para baixo 10 vezes. Coloque o número adequado de tiras de tubos no bloco de carregamento, de acordo com a configuração exibida na Tabela 7. Adicione imediatamente $20 \mu\text{L}$ da mistura principal de ensaio adequada a cada tubo para PCR. As tampas permanecem no recipiente plástico até serem necessárias.

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

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

5. Adicione imediatamente 5 µL de água para NTC aos tubos nas posições 9 a 16 e coloque tampas nos tubos.
6. Adicione 5 µL de cada amostra aos tubos de amostra (posições de tubos 17 a 24, 25 a 32, 33 a 40, 41 a 48, 49 a 56, 57 a 64 e 65 a 72) e coloque tampas nos tubos.
7. Adicione 5 µL de PC do EGFR aos tubos nas posições 1 a 8 e coloque tampas nos tubos.
- Tome cuidado para evitar erros de carregamento ou de pipetagem, para garantir a adição correta de NTC, de amostras e de PC do EGFR nos tubos adequados.
- Cada tubo deve conter um volume de reação total de 25 µL (20 µL de mistura principal de ensaio preparada no passo 3 (Tabela 6) mais 5 µL de NTC/amostra/PC). Os números representam as posições no bloco de carregamento e indicam a posição final no rotor.
- Marque as tampas dos tubos para indicar a direção de carregamento dos tubos no equipamento Rotor-Gene Q MDx.
8. Depois de colocar as tampas em todos os tubos da PCR, efetue uma verificação visual dos níveis de preenchimento dos tubos de amostra, para garantir que amostra foi adicionada a todos os tubos.

9. Inverta todos os tubos da PCR quatro vezes para misturar as amostras e as misturas de reação.

10. Coloque os tubos para PCR nas posições adequadas no rotor de 72 poços, de acordo com a configuração exibida na Tabela 7.

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

11. Coloque imediatamente o rotor de 72 poços no equipamento Rotor-Gene Q MDx.

Certifique-se de que o anel de travamento (acessório do equipamento Rotor-Gene Q MDx) é colocado por cima do rotor para prender os tubos durante a execução.

Nota: para a detecção manual de mutações EGFR, veja “Anexo A: Protocolo do Manual do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR”, página 73.

12. Inicie o software Rotor-Gene Q clicando duas vezes no ícone “*therascreen* EGFR CE Locked Template” da área de trabalho do computador portátil conectado ao equipamento Rotor-Gene Q MDx (Figura 10).



Figura 10. Ícone EGFR CE Locked Template (detecção de mutação EGFR).

13. A guia “Setup” (Configuração) é exibida por padrão (Figura 11). Certifique-se de que o anel de travamento está anexado corretamente e marque a caixa “Locking Ring Attached” (Anel de travamento anexado). Feche a tampa do equipamento Rotor-Gene Q MDx.

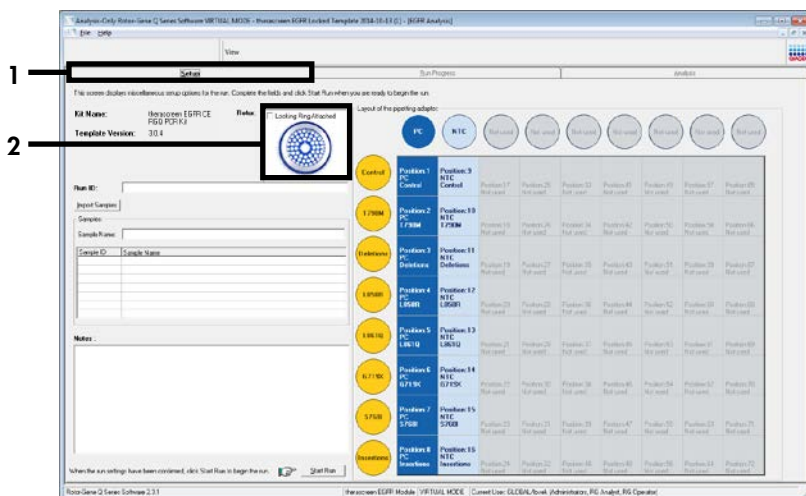


Figura 11. A guia “Setup” (Configuração) (1) e a caixa “Locking Ring Attached” (Anel de travamento anexado) (2).

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

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

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

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

Nota: até sete amostras podem ser adicionadas. As IDs de amostras (nos círculos de amostras) são atribuídas automaticamente, de 1 a 7.

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

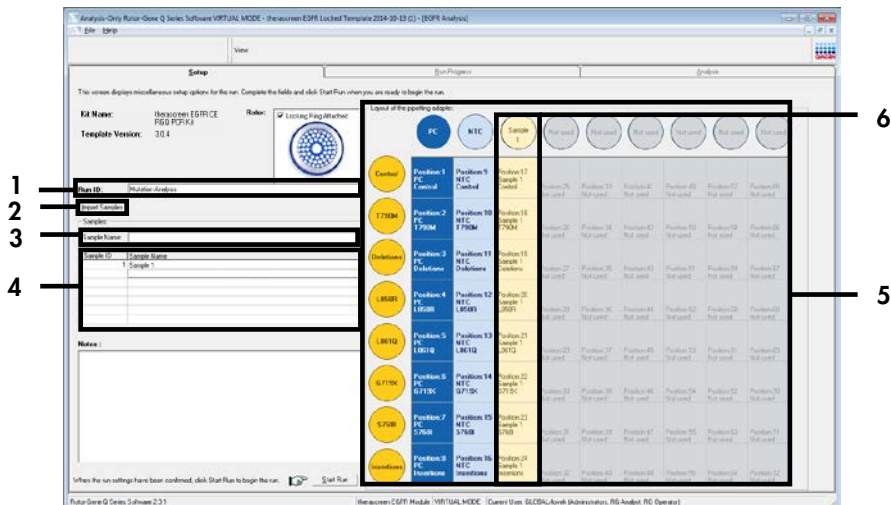


Figura 12. Inserção da “Run ID” (ID da execução) e do “Sample Name” (Nome da amostra). 1 = campo de diálogo “Run ID” (ID da execução); 2 = botão “Sample Import” (Importação de amostras); 3 = campo de diálogo “Sample Name” (Nome da amostra); 4 = “Sample List” (lista de amostras); 5 = painel “Layout of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

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

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

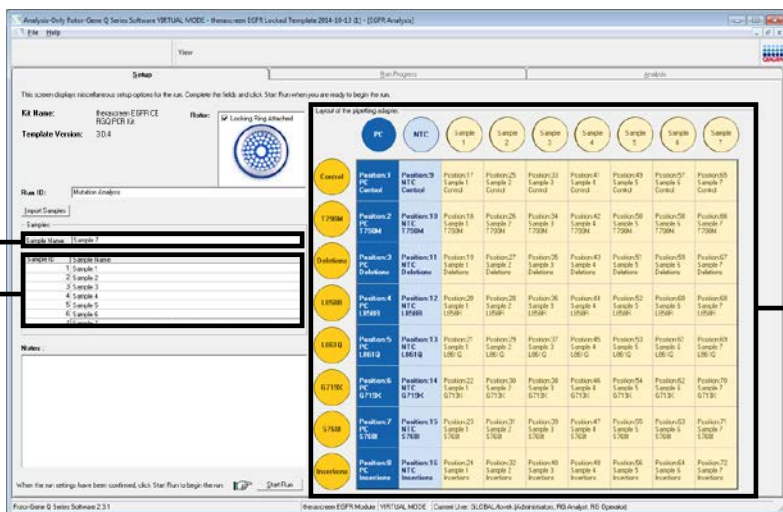


Figura 13. Inserção de nomes de amostras adicionais no campo de diálogo “Sample Name” (Nome da amostra). 1 = campo de diálogo “Sample Name” (Nome da amostra); 2 = “Sample List” (lista de amostras); 3 = painel “Layout of the pipetting adapter” (Configuração do adaptador de pipetagem).

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

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

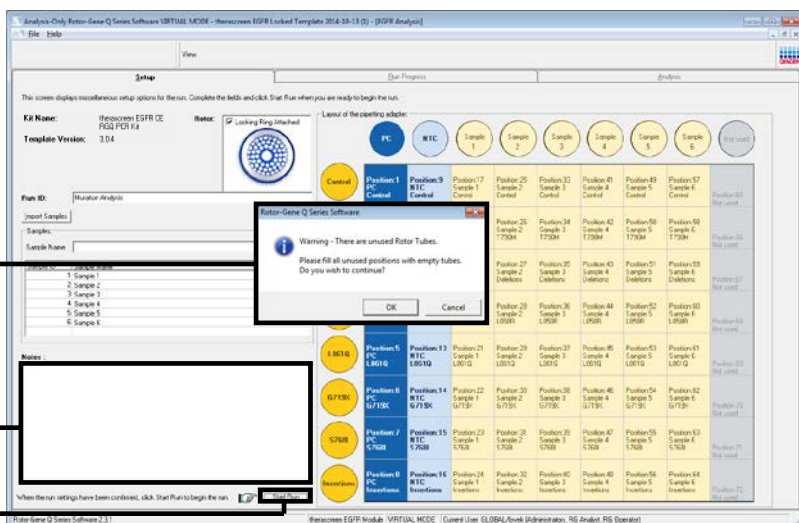


Figura 14. Campo de diálogo “Notes” (Notas) (1), botão “Start Run” (Iniciar execução) (2) e “Warning” (Advertência) das posições não usadas do rotor (3).

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

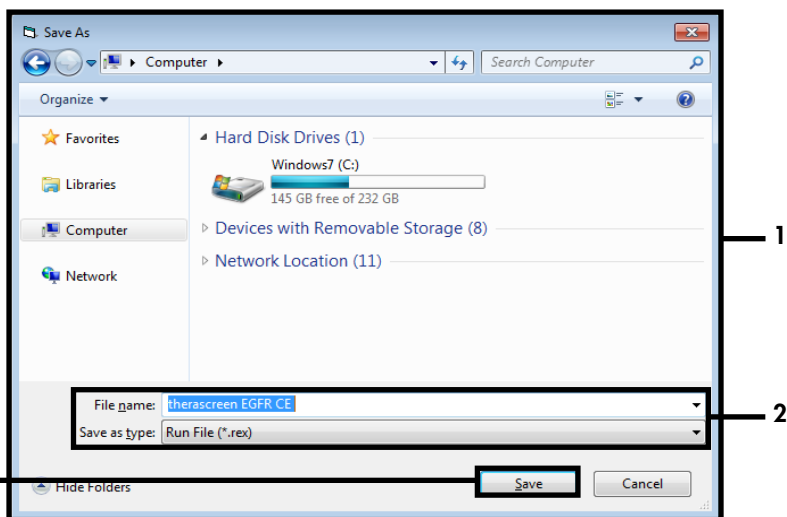


Figura 15. Janela “Save As” (Salvar como) (1). 2 = campos “File Name” (Nome do arquivo) e “Save as type” (Salvar como tipo); 3 = “Save” (Salvar).

18.A execução da PCR inicia-se.

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

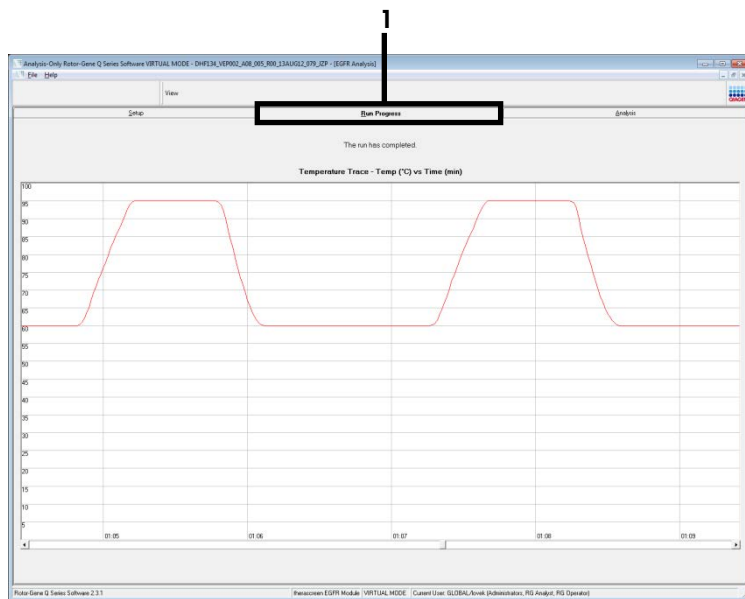


Figura 16. "A guia "Run Progress" (Evolução da execução).

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

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

Nota: uma explicação do método de cálculo é exibida na seção "Interpretação de resultados (Automatizados)", página 48.

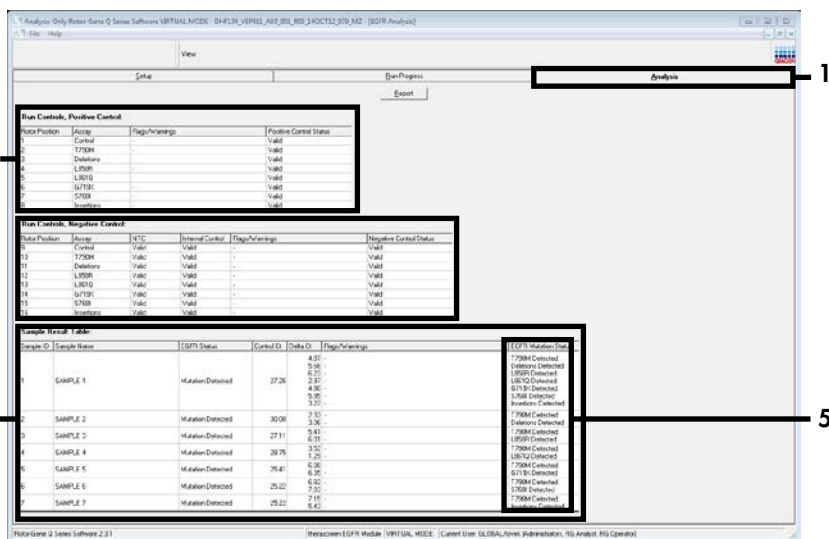


Figura 17. A guia "Analysis" (Análise) (1) e a exibição de resultados. 2 = painel "Run Controls, Positive Control" (Controles da execução, Controle Positivo); 3 = painel "Run Controls, Negative Control" (Controles da execução, Controle Negativo); 4 = "Sample Result Table" (Tabela de resultados de amostras);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

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

Controles da execução, Controle Positivo: Se os resultados estiverem dentro da faixa aceitável, o "Positive Control Status" (Estado do Controle Positivo) exibirá "Valid" (Válido), caso contrário exibirá um resultado "Invalid" (Inválido).

Controles da execução, Controle Negativo: Se os resultados "NTC" e "Internal Control" (Controle interno) se encontrarem dentro das faixas aceitáveis, o "Negative Control Status" (Estado do Controle Negativo) exibirá "Valid" (Válido), caso contrário exibirá um resultado "Invalid" (Inválido).

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

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

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

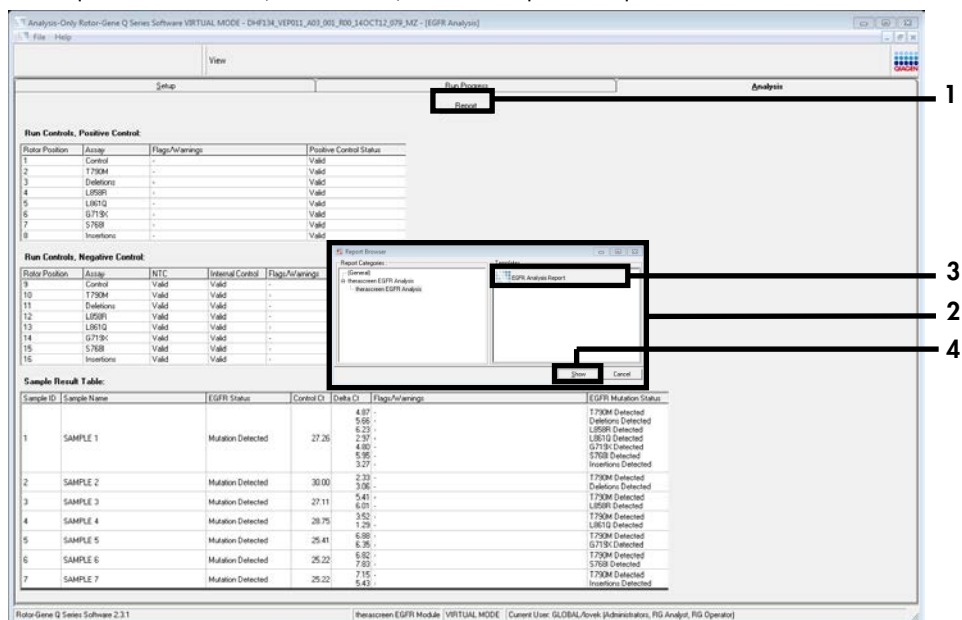


Figura 18. Seleção de “EGFR CE Analysis Report” (Relatório de análise EGFR CE). 1 = “Report” (Relatório); 2 = painel de “Report Browser” (Navegador de relatórios); 3 = “EGFR CE Analysis Report” (Relatório de análise EGFR CE); 4 = “Show” (Mostrar).

Interpretação de resultados (Automatizados)

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

Nota: para a análise manual de resultados, veja “Interpretação de resultados (Manual)”, na página 89.

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

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

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

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

As amostras são classificadas como sendo positivas quanto a mutação, se tiverem um ΔC_T inferior ou igual ao valor de ΔC_T de cut-off desse ensaio. Acima deste valor, a amostra poderá conter menos do que a porcentagem de mutação capaz de ser detectada pelo Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (estar para além do limite dos ensaios), ou a amostra poderá ser negativa quanto a mutação, o que seria indicado como “No Mutation Detected” (Nenhuma mutação detectada).

Sem amplificação nas reações de mutação será classificado como “No Mutation Detected” (Nenhuma mutação detectada). Os valores de ΔC_T calculados a partir da amplificação de fundo são supostamente superiores aos valores de ΔC_T de cut-off e a amostra será classificada como “No Mutation Detected” (Nenhuma mutação detectada).

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

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

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

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

Por exemplo:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = o ensaio de controle (CTRL_ASSAY) do controle positivo (PC) falhou (FAIL)

- NTC_INT_CTRL_FAIL = o controle interno (INT_CTRL) do controle sem modelo (NTC) falhou (FAIL)
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = o ensaio de controle (CTRL) da amostra (SAMPLE) tem uma concentração alta (HIGH_CONC).

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

Alarme	Significado	Ação
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Execução de PCR inválida – C_T de FAM fora da faixa para o controle positivo na reação de controle.	Repita toda a execução de PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Execução de PCR inválida – C_T de FAM fora da faixa para uma ou mais reações de controle de mutação.	Repita toda a execução de PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Execução de PCR inválida – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle positivo (mistura de reação de controle).	Repita toda a execução de PCR.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Execução de PCR inválida – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle positivo (mistura da reação de mutação).	Repita toda a execução de PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Execução de PCR inválida – controle interno acima da faixa para o controle negativo.	Repita toda a execução de PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Execução de PCR inválida – controle interno abaixo da faixa para o controle negativo.	Repita toda a execução de PCR.
NTC_INVALID_CT	Execução de PCR inválida – FAM inválido (inferior ao limite) para o controle negativo.	Repita toda a execução de PCR.
NTC_INVALID_DATA	Execução de PCR inválida – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle negativo.	Repita toda a execução de PCR.

Alarme	Significado	Ação
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Execução de PCR inválida – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle da amostra.	Prepare uma nova execução de PCR para repetir a(s) amostra(s) relevante(s).
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Amostra inválida – CT de FAM demasiado baixo no controle da amostra.	Dilua a amostra para aumentar o valor do C_T do controle. Esta diluição deve ser calculada assumindo que diluindo 1:1 com a água fornecida no kit, aumentará o C_T em 1,0; quando a amostra estiver diluída, prepare uma nova execução de avaliação de mutação para repetir a amostra. Ou, se a amostra tiver sido diluída após a execução de avaliação de amostras de DNA, avance diretamente para a execução de detecção de mutações EGFR com a amostra diluída.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Amostra inválida – C_T de FAM demasiado alto na reação de controle da amostra.	Prepare uma nova execução de PCR para repetir a amostra. Se a amostra for inválida na repetição da execução de PCR e se a quantidade de DNA continuar sendo insuficiente, extraia mais dois cortes de tecido FFPE, se disponível. Prepare uma nova execução de PCR para testar esta extração. Se a amostra for inválida, repita a execução de PCR na segunda extração. Se a amostra não tiver um resultado válido após esta execução, um estado de mutação indeterminado é atribuído à amostra, e não devem ser efetuados mais testes.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	CT demasiado alto (ou sem C_T) para o controle interno (HEX), canal FAM negativo quanto a mutação.	<p>Para as amostras que geram um alarme de SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Amostra positiva e inválida) com uma mutação detectada (ou não detectada) em uma mistura da reação de mutação clinicamente relevante – relate os resultados, não é preciso efetuar mais testes.</p> <p>Dilua a amostra com a água fornecida no kit, assumindo que diluindo 1:1 aumentará o C_T da reação de controle em 1,0, garantindo que o volume final é de > 40 μL (ex., 40 μL de DNA e 40 μL de água do tubo marcado DIL).</p> <p>Prepare uma nova execução de PCR para repetir a amostra. Se inválida na repetição da execução de PCR, extraia a amostra de outros dois cortes FFPE. Prepare uma nova execução de PCR para testar esta extração.</p> <p>Se a segunda extração for inválida, dilua como descrito acima.</p> <p>Se a amostra não tiver um resultado válido após esta execução, um estado de mutação indeterminado é atribuído à amostra, e não devem ser efetuados mais testes.</p>

Alarme	Significado	Ação
SAMPLE_INT_CTRL_ EARLY_CT	Tubo de mutação inválido – C _T HEX demasiado baixo para a amostra (controle interno)	<p>Para as amostras que geram um alarme de SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Amostra positiva e inválida) com uma mutação detectada (ou não detectada) em uma mistura da reação de mutação clinicamente relevante – relate os resultados, não é preciso efetuar mais testes.</p> <p>Prepare uma nova execução de PCR para repetir a amostra. Se a repetição da execução de PCR for inválida, extraia mais dois cortes de tecido FFPE, se disponível. Prepare uma nova execução de PCR para testar esta extração. Se for inválida, repita a execução de PCR na segunda extração. Se a amostra não tiver um resultado válido após esta execução, um estado de mutação indeterminado é atribuído à amostra, e não devem ser efetuados mais testes.</p>
SAMPLE_INVALID_DATA	Tubo de mutação inválido – não é possível interpretar os dados de fluorescência no controle interno.	<p>Para as amostras que geram um alarme de SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Amostra positiva e inválida) com uma mutação detectada (ou não detectada) em uma mistura da reação de mutação clinicamente relevante – relate os resultados, não é preciso efetuar mais testes.</p> <p>Prepare uma nova execução de PCR para repetir a amostra. Se a repetição da execução de PCR for inválida, extraia mais dois cortes de tecido FFPE, se disponível. Prepare uma nova execução de PCR para testar esta extração. Se for inválida, repita a execução de PCR na segunda extração. Se a amostra não tiver um resultado válido após esta execução, um estado de mutação indeterminado é atribuído à amostra, e não devem ser efetuados mais testes.</p>

Alarme	Significado	Ação
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Uma ou mais mutações de uma amostra são positivas e, ao mesmo tempo, uma ou mais mutações da mesma amostra são inválidas.	<p>Para as amostras que geram um alarme de SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Amostra positiva e inválida) com uma mutação detectada (ou não detectada) em uma mistura da reação de mutação clinicamente relevante – relate os resultados, não é preciso efetuar mais testes.</p> <p>Para as amostras que geram um alarme de SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Amostra positiva e inválida) com um resultado INVALID (Inválido) obtido em uma mistura da reação de mutação clinicamente relevante, teste novamente a amostra com todas as misturas de reação seguindo a ação específica de alarme inválido.</p> <p>Se um alarme SAMPLE_INT_CTRL_FAIL for gerado em combinação com outro alarme para a amostra afetada, então deve ser seguida a ação de diluição da amostra do alarme SAMPLE_INT_CTRL_FAIL. Prepare uma nova execução de PCR e teste novamente a amostra.</p> <p>Para as amostras que geram um alarme de SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Amostra positiva e inválida) com um resultado INVALID (Inválido) obtido em uma mistura da reação de mutação clinicamente relevante na execução da repetição da PCR, extraia a amostra de outros dois cortes FFPE. Prepare uma nova execução de PCR com todas as misturas de reação para testar esta extração.</p> <p>Se esta amostra produzir novamente um resultado inválido para uma mistura da reação de mutação clinicamente relevante, repita a amostra com todas as misturas de reação seguindo a ação específica de alarme inválido. Se SAMPLE_INT_CTRL_FAIL for gerado em combinação com outro alarme para a amostra afetada, então deve ser seguida a ação de diluição da amostra do alarme SAMPLE_INT_CTRL_FAIL. Prepare uma nova execução de PCR e teste novamente esta amostra.</p> <p>Se o alarme SAMPLE_POS_AND_INVALID for observado após esta repetição, será atribuído um estado de mutação indeterminado à amostra.</p>

Guia de solução de problemas

Este guia de resolução de falhas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de suporte técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas dos Serviços técnicos da QIAGEN estão sempre felizes em responder quaisquer perguntas que você possa ter sobre as informações e protocolos nesse manual ou tecnologias de amostragem e ensaio (para informações de contato, veja a contracapa ou acesse www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

Amostras de NTC apresentam resultados positivos no canal verde FAM

Ocorreu contaminação durante o preparo da PCR

Repita a PCR com novos reagentes nas réplicas.

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

Certifique-se de que o local de trabalho e os equipamentos são descontaminados regularmente.

Nenhum sinal com o controle positivo do EGFR

a) O canal de fluorescência selecionado para análise de dados de PCR não cumpre os requisitos do protocolo

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

b) Programação incorreta do perfil de temperatura do equipamento Rotor Gene Q MDx

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

c) Configuração incorreta da PCR

Verifique os seus passos de trabalho com relação ao esquema de pipetagem e repita a PCR, caso seja necessário.

d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em "Armazenamento e manuseio de reagentes" (página 19)

Verifique as condições de armazenamento e a data de validade (veja o rótulo do kit) dos reagentes e utilize um kit novo, se necessário.

e) A data de validade do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR expirou

Verifique as condições de armazenamento e a data de validade (veja o rótulo do kit) dos reagentes e utilize um kit novo, se necessário.

Controle de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade da QIAGEN, com certificação ISO, todos os lotes do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR são testados relativamente a especificações predeterminadas para garantir a qualidade constante do produto.

Limitações

Os resultados do produto devem ser interpretados no contexto de todos os resultados clínicos e laboratoriais relevantes e não devem ser utilizados para diagnóstico de forma isolada.

O produto somente deve ser utilizado por pessoal devidamente treinado e especializado em procedimentos de diagnóstico *in vitro* e equipamentos Rotor-Gene Q MDx.

O produto destina-se a uso exclusivo no ciclador de PCR em tempo real do Rotor-Gene Q MDx.

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

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

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

Características de desempenho

Desempenho analítico

As características de desempenho específicas do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR foram determinadas por estudos que utilizaram amostras de tecido FFPE coletadas de pacientes com NSCLC e linhas celulares humanas FFPE (linhas celulares FFPE). As linhas celulares FFPE foram geradas utilizando uma linha celular de carcinoma pulmonar (A549) para produzir linhas celulares contendo as mutações EGFR específicas pretendidas. Quando não estavam disponíveis amostras de tecido ou linhas celulares, foi utilizado DNA plasmídeo.

Limite do branco (LOB) faixa de trabalho e valores de cut-off

417 amostras FFPE foram testadas em um estudo que segue as indicações da diretriz NCCLS EP17-A (2004) (12) para determinar o LOB e os valores de cut-off de cada ensaio de mutação. Além disso, a faixa de trabalho foi determinada. Os valores de cut-off foram estabelecidos e são exibidos na Tabela 9.

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

Ensaio	Cut-off (ΔCT)
T790M	$\leq 7,40$
Deleções	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$
L861Q	$\leq 8,90$
G719X	$\leq 8,90$
S768I	$\leq 8,90$
Inserções	$\leq 8,00$

A faixa do C_T da reação de controle foi estabelecida como sendo um C_T entre 23,70 e 31,10.

Os valores de cut-off do ensaio e as faixas de trabalho foram verificados utilizando padrões e outras amostras FFPE. Durante a verificação, os cut-offs foram avaliados para verificar a capacidade de distinguir a mutação correta em um fundo de DNA de tipo selvagem, avaliando-se cada ensaio com concentração alta de entrada de DNA genômico e concentração alta de entrada de DNA de mutação (veja “Reatividade cruzada”, na página 58). O efeito da entrada de DNA na determinação da mutação também foi avaliada (veja “Efeito da entrada de DNA em valores ΔC_T ”, na página 57).

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

Efeito da entrada de DNA em valores ΔC_T

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

Reatividade cruzada

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

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

Exatidão: Comparação com o método de referência analítica

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

Foram analisadas amostras com resultados válidos tanto por Sanger quanto pelo Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, para avaliar a concordância na percentagem de positivos (Positive Percent Agreement, PPA), a concordância na percentagem de negativos (Negative Percent Agreement, NPA) e a concordância na percentagem global (Overall Percent Agreement, OPA). Estes resultados, juntamente com as faixas de confiança (confidence intervals, IC) de 95% bilaterais correspondentes, são resumidos na Tabela 10.

Tabela 10. Análise de concordância

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

Para os 28 resultados discordantes da concordância na percentagem global:

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

Valores de limite de detecção (LOD)

Um estudo foi efetuado para determinar o LOD de cada uma das 29 mutações EGFR. O LOD foi definido como a quantidade menor de DNA mutante em um fundo de DNA de tipo selvagem com o qual uma amostra mutante produzirá resultados positivos quanto a mutação em 95% dos resultados de teste (C₉₅).

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

Tabela 11. O LOD estabelecido utilizando amostras clínicas FFPE a um nível baixo e alto de entrada de DNA, linhas celulares FFPE ou plasmídeos

Éxon	Mutação	ID COSMIC*	Mudança de base	LOD (% mutante)	
				Baixo	Alto
18	G719A	6239	2156G>C	7,41†	1,57†

Éxon	Mutação	ID COSMIC*	Mudança de base	LOD (% mutante)	
				Baixo	Alto
19	G719S	6252	2155G>A	5,08 [‡]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [‡]	— [¶]
	Deleções	12384	2237_2255>T	1,58 [§]	0,49 [§]
		12387	2239_2258>CA	4,91 [†]	1,48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16,87 [†]	12,47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3,24 [†]	1,65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4,24 [†]	1,41 [†]
		12678	2237_2251del15	0,55 [§]	0,24 [§]
		6218	2239_2247del9	8,47 [†]	— [¶]
		12728	2236_2253del18	2,43 [†]	— [¶]
		12367	2237_2254del18	2,72 [†]	— [¶]
		6210	2240_2251del12	4,09 [†]	— [¶]
		6220	2238_2255del18	2,70 [†]	0,82 [†]
		6223	2235_2249del15	6,40 [†]	1,63 [†]
		6225	2236_2250del15	2,80 [†]	1,42 [†]
		6254	2239_2253del15	0,86 [§]	0,47 [§]
		6255	2239_2256del18	0,14 [§]	0,05 [§]
		12369	2240_2254del15	4,94 [§]	1,56 [§]
		12370	2240_2257del18	8,10 [§]	2,08 [§]
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0,25 [§]	0,10 [§]
		12383	2239_2251>C	4,58 [§]	1,74 [§]
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Inserções	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11,61 [†]	— [¶]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [†]	1,31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [†]	0,65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9,72 [†]	5,09 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [†]	1,13 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [†]	0,66 [†]

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

† Os valores de LOD foram estabelecidos utilizando linhas celulares.

‡ Os valores de LOD foram estabelecidos utilizando plasmídeos.

§ Os valores de LOD foram estabelecidos utilizando amostras clínicas.

¶ Não avaliado

Interferência

Efeitos de tecido necrótico

As amostras clínicas FFPE de NSCLC com conteúdo de tecido necrótico até 50%, tanto para mutante de EGFR quanto para amostras de tipo selvagem, não interferiram com os resultados de determinações do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Substâncias exógenas

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

Reprodutibilidade

Reprodutibilidade lote a lote

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

Manuseio de amostras

A reprodutibilidade do Kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue foi examinada utilizando cortes tirados de 3 blocos de amostras FFPE, especificamente de uma amostra de mutação de deleção do éxon 19 (2235-2249 del15), uma amostra de mutação L858R do éxon 21 e uma amostra de tipo selvagem. Para cada amostra, extrações foram realizadas em duplicado em três locais e testadas em três dias não consecutivos por um período de seis dias, produzindo um total de 18 pontos de dados por amostra. Em cada local, 2 operadores efetuaram os testes utilizando um lote do Kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (um lote por local, 3 lotes no total) em combinação com o mesmo lote dos reagentes do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR em todos os locais. Todos os resultados de amostras de tipo selvagem e mutantes foram válidos e produziram o resultado de determinação previsto (determinação correta = 100%, 18/18 para cada amostra), suportando a reprodutibilidade e repetibilidade para o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR no passo pré-analítico do isolamento do DNA.

Exatidão e reprodutibilidade

A exatidão e reprodutibilidade do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR foi investigada testando o DNA extraído de amostras clínicas FFPE de NSCLC ou linhas celulares FFPE, representando todos os 7 ensaios de mutação do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Amostras clínicas FFPE de tipo selvagem de NSCLC (Tabela 12) também foram incluídas no estudo.

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

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

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

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

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

Desempenho clínico

Dados de resultados clínicos: GIOTRIF®

O ensaio clínico LUX-Lung 3 foi um ensaio internacional, multicêntrico, de segmento aberto, randomizado da Fase 3 do afatinib versus quimioterapia como tratamento de primeira linha para pacientes com adenocarcinoma de estágio IIIB ou IV do pulmão contendo uma mutação de ativação do EGFR (ClinicalTrials.gov número NCT00949650). A elegibilidade de um paciente para participar no ensaio foi determinada testando o estado da mutação EGFR do paciente utilizando o Clinical Trial Assay (CTA). Testes retrospectivos de amostras de tecidos foram efetuados utilizando o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Um estudo comparativo foi efetuado para avaliar a concordância entre o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR e o CTA.

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

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

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

* Estratificado por estado de mutação EGFR e raça.

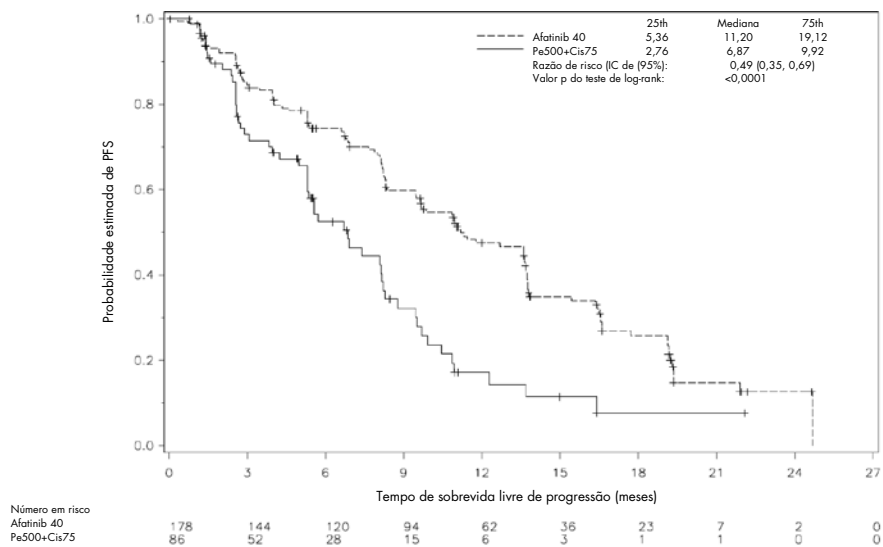


Figura 19. Curva de Kaplan-Meier da sobrevivência livre de progressão (PFS) por exame independente por grupo de tratamento (população Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR+/CTA+).

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

Dados de resultados clínicos: IRESSA®

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

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

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

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

Os resultados da eficácia geral estão resumidos na Tabela 14.

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

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

BICR: Exame Independente e Imparcial Central (Blinded independent central review); **CI:** Intervalo de confiança (Confidence Interval); **CTA:** Ensaio de avaliação clínica (Clinical Trial Assay).

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

Dado que o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR não foi usado para selecionar os pacientes para a avaliação clínica IFUM, as análises de eficácia adicional foram efetuadas para considerar pacientes que não estavam incluídos na avaliação, porque deram resultado negativo por CTA, mas podem ter dado resultado positivo pelo Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (ou seja, Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR+/CTA-), bem como pacientes que participaram na avaliação, mas não tiveram resultados válidos de novos testes do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (ou seja, Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR desconhecido/CTA+). Os resultados de todas as análises hipotéticas foram geralmente semelhantes aos da análise de eficácia primária.














Referências

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

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

Símbolos

Os seguintes símbolos podem aparecer no pacote e no rótulo:

Símbolo	Definição do símbolo
 <N>	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Data de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Referência
	Número do lote
	Número do material
	Proteger da luz
	Número Global de Item Comercial (Global Trade Item Number)
	Representante autorizado
R_n	R representa a revisão das Instruções de Uso (Manual) e n representa o número de revisão
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consulte as instruções de uso
	Aviso

Anexo A: Protocolo do Manual do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

Esta seção contém instruções para utilizar o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR com o software Rotor-Gene Q versão 2.3 no modo aberto (ou seja, sem utilizar o Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Informações gerais

- Para uma lista dos materiais necessários, veja “Materiais necessários mas não fornecidos”, na página 15.
- Para instruções completas sobre a preparação de amostras e a disposição de amostras, veja “Protocolo: Avaliação de amostras”, na página 22 e “Protocolo: Detecção de mutações EGFR”, na página 35.
- Certifique-se de que os parâmetros de ciclagem estão corretos antes de iniciar cada execução.

Protocolo: Criar um perfil de temperatura

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

Procedimento

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

Tabela 15. Perfil de temperatura

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

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

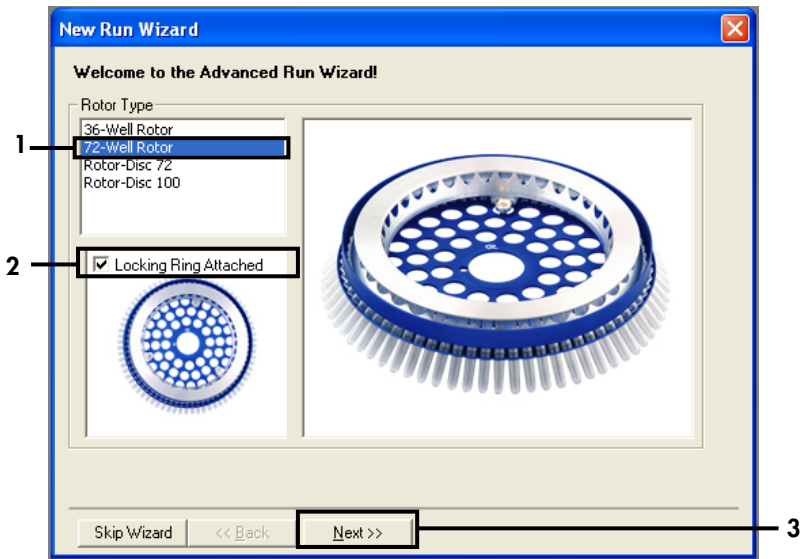


Figura 20. A caixa de diálogo “New Run Wizard”. 1 = “Rotor type” (Tipo de rotor); 2 = caixa de “Locking Ring Attached” (anel de travamento anexado); 3 = “Next” (Avançar).

4. Insira o nome do operador. Adicione as notas que você desejar e insira 25 em “Reaction Volume” (Volume de reação). Certifique-se de que “Sample Layout” (Disposição das amostras) exibe “1, 2, 3...”. Clique em “Next” (Avançar) (Figura 21).

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator :

Notes :

Reaction Volume (µL):

Sample Layout :

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

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

5. Clique em “Edit Profile” (Editar perfil) na caixa de diálogo “New Run Wizard” (Assistente de nova execução) (Figura 22) e verifique os parâmetros da execução de acordo com os passos seguintes.

7. Altere “Hold Temperature” (Temperatura em espera) para 95 °C e “Hold Time” (Tempo em espera) para 15 min. O s Clique em “Insert After” (Inserir após) e, em seguida, selecione “New Cycling” (Nova ciclagem) (Figura 24).

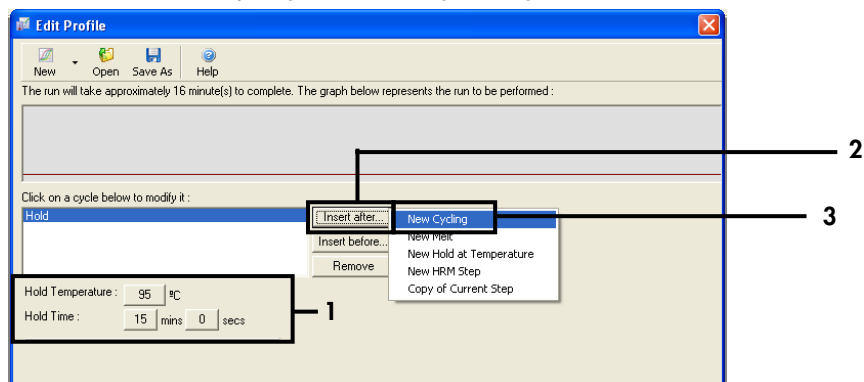


Figura 24. Passo inicial de incubação a 95°C. 1 = botões “Hold Temperature and Hold Time” (Temperatura em espera e tempo em espera); 2 = “Insert after” (Inserir após); 3 = “New Cycling” (Nova ciclagem).

8. Altere o número de repetições de ciclo para 40. Selecione o primeiro passo e configure como “95°C for 30 secs” (95 °C por 30 segundos) (Figura 25).

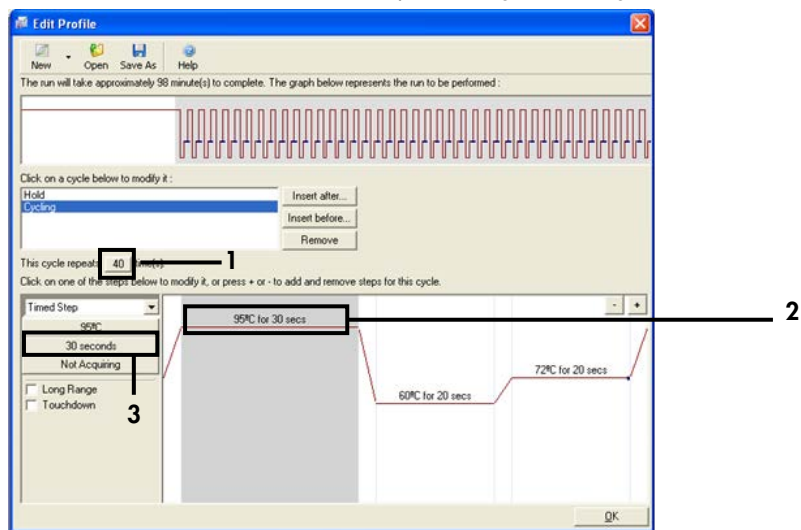


Figura 25. Passo de ciclagem a 95 C 1 = caixa “Cycle repeats” (Repetições de ciclo); 2 = passo um: definição da temperatura; 3 = Passo um: definição do tempo.

9. Realce o segundo passo e configure como “60°C for 60 secs” (60 °C por 60 segundos).
Ative a aquisição de dados durante este passo, selecionando o botão “Not Acquiring” (Não adquirir dados) (Figura 26).

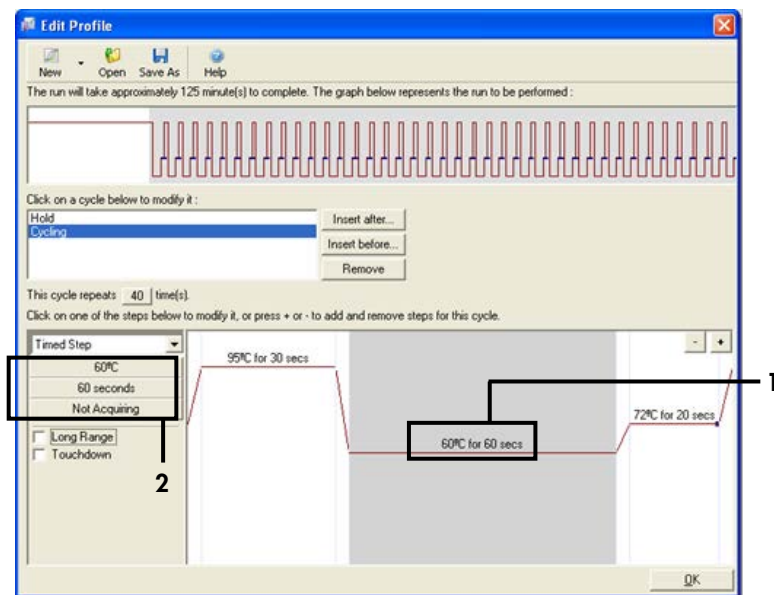


Figura 26. Passo de ciclagem a 60°C 1 = Passo dois: definição de temperatura e tempo; 2 = “Not Acquiring” (Não adquirir dados).

10. Configure “Green” (Verde) e “Yellow” (Amarelo) como os canais de aquisição, selecionando “>” para transferir estes canais da lista “Available Channels” (Canais disponíveis). Clique em “OK” (Figura 27).

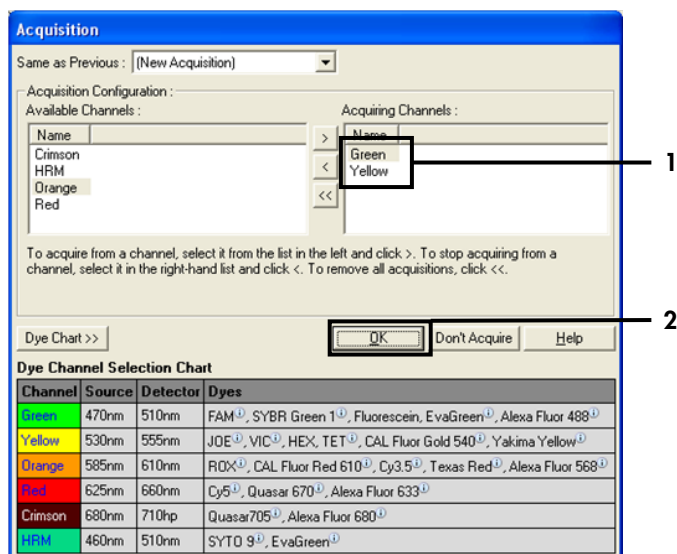


Figura 27. Aquisição de dados no passo de ciclagem a 60°C. 1 = Canais selecionados; 2 = botão "OK".

11. Realce o terceiro passo e exclua clicando em "-". Clique em "OK" (Figura 28).

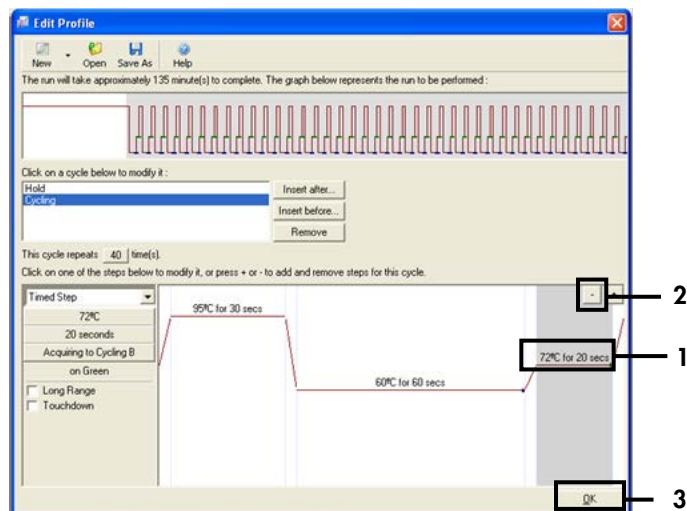


Figura 28. Remoção do passo de extensão. 1 = Terceiro passo; 2 = Excluir; 3 = "OK".

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

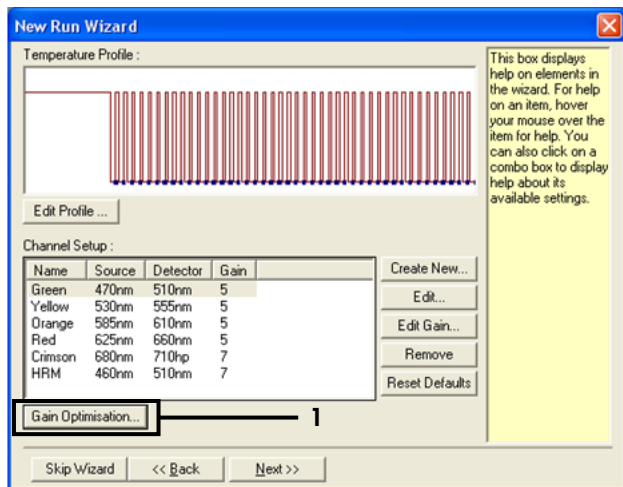


Figura 29. Otimização de aquisição de dados (1).

13. Clique em “Optimise Acquiring” (Otimizar aquisição de dados). As configurações para cada canal são exibidas. Aceite estes valores padrão, clicando “OK” para ambos os canais (Figura 30).

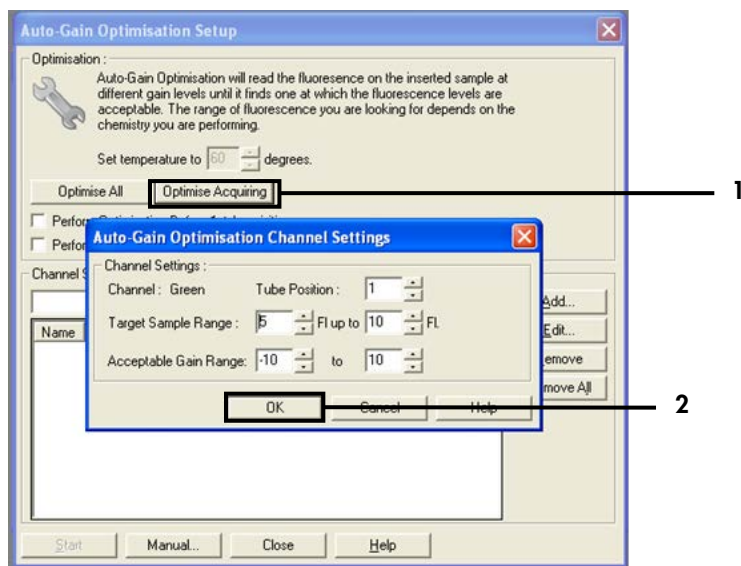


Figura 30. Otimização de ganho automático para o canal verde. 1 = "Optimise Acquiring" (Otimizar aquisição de dados); 2 = "OK".

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

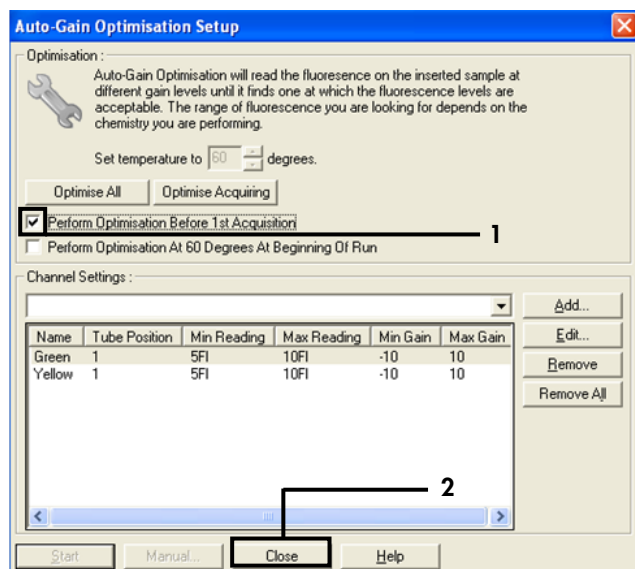


Figura 31. Seleção dos canais verde e amarelo. 1 = caixa de seleção "Perform Optimisation before 1st Acquisition" (Efetuar otimização antes da 1ª aquisição); 2 = "Close" (Fechar).

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

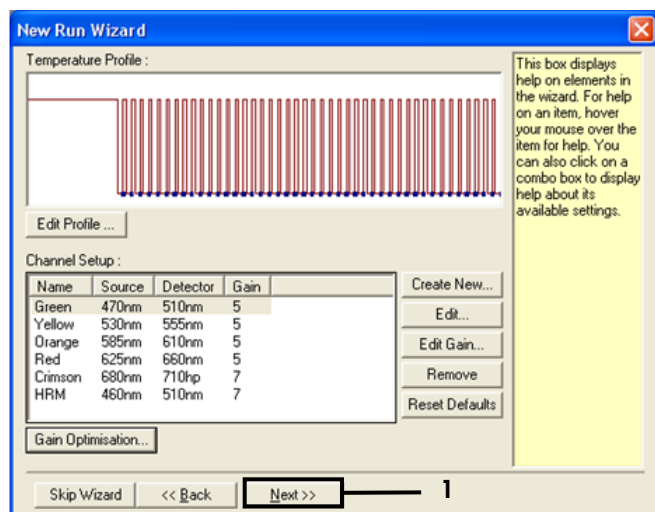


Figura 32. "Next" (Avançar) (1).

Procedimento (Manual)

Protocolo: Avaliação de amostras (manual)

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

- Prepare as amostras como descrito em “Protocolo: Avaliação de amostras” na página 22, até o passo 11.
- Configure a execução PCR em um equipamento Rotor-Gene Q MDx, como descrito na seção “Protocolo: Configuração Rotor-Gene Q do Kit theascreen EGFR RGQ PCR” na página 84.
- Depois de terminar a execução, analise os dados de acordo com as instruções da seção “Análise de dados de avaliação de amostras”, na página 90.

Protocolo: Detecção de mutações EGFR (manual)

- Após uma amostra ter sido aprovada na avaliação de amostras, ela pode ser testada para detectar mutações EGFR.
- Prepare as amostras conforme descrito na seção “Protocolo: de detecção de mutação EGFR” na página 35, até o passo 11.
- Configure a execução PCR em um equipamento Rotor-Gene Q MDx, como descrito na seção “Protocolo: Configuração Rotor-Gene Q do Kit theascreen EGFR RGQ PCR” na página 84.
- Depois de terminar a execução, analise os dados de acordo com as instruções da seção “Análise de dados de detecção de mutação EGFR”, na página 92.

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

Procedimento

1. Abra o software Rotor-Gene Q series, versão 2.3 e abra o perfil de temperatura (arquivo *.ret) adequado do *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Para instruções sobre como criar o perfil de temperatura e verificar os parâmetros de execução, veja “Protocolo: Criar um perfil de temperatura”, na página 72.

2. Certifique-se de que o rotor correto é selecionado e marque a caixa para confirmar que o anel de travamento está anexado. Clique em “Next” (Avançar) (Figura 33).

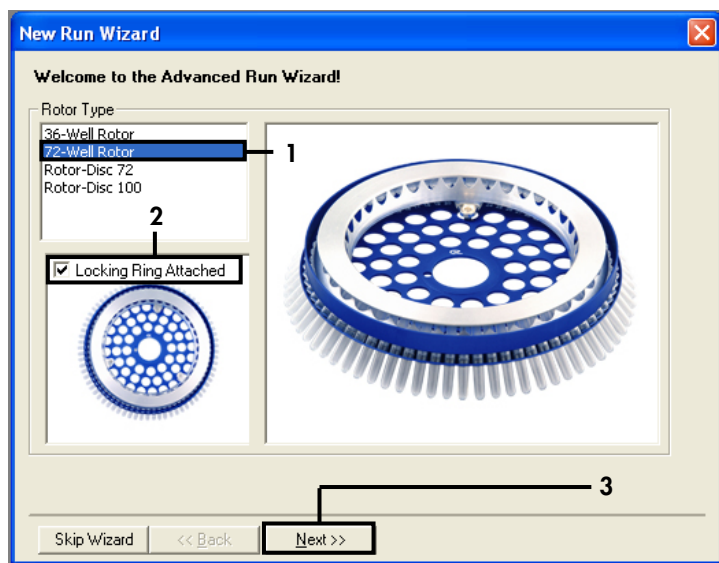


Figura 33. A caixa de diálogo “New Run Wizard” (Assistente de nova execução) e tela de boas-vindas. 1 = “Rotor type” (Tipo de rotor); 2 = caixa de “Locking Ring Attached” (anel de travamento anexado); 3 = “Next” (Avançar).

3. Insira o nome do operador. Adicione as notas que você desejar, certifique-se de que “Reaction Volume” (Volume de reação) está configurado como 25 e que a caixa “Sample Layout” (Disposição das amostras) exibe “1, 2, 3...”. Clique em “Next” (Avançar) (Figura 34).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' window. The title bar is blue with the text 'New Run Wizard' and a close button. The main content area is light gray. It contains the following elements:

- Operator:** A text input field with the placeholder 'NAME', labeled with a '1'.
- Notes:** A large text area for notes, labeled with a '2'.
- Reaction Volume (µL):** A numeric input field with the value '25', labeled with a '3'.
- Sample Layout:** A dropdown menu showing '1, 2, 3...', labeled with a '4'.
- Buttons:** At the bottom, there are three buttons: 'Skip Wizard', '<< Back', and 'Next >>' (labeled with a '5').
- Help Box:** A yellow box on the right side with the text: 'This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.'

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

4. A janela seguinte permite editar o perfil de temperatura. (Não é necessário editar nada, porque o perfil de temperatura foi criado de acordo com as instruções em “Protocolo: Criar um perfil de temperatura”, na página 72). Clique em “Next” (Avançar) (Figura 35).

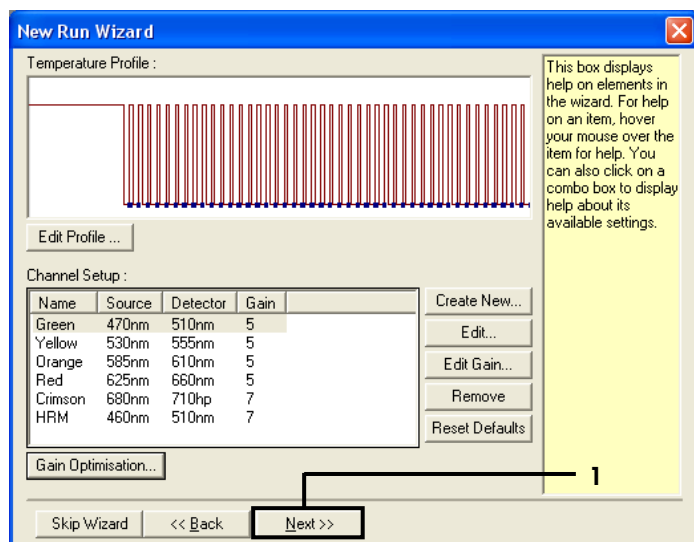


Figura 35. A caixa de diálogo do “New Run Wizard” (Assistente de nova execução) e a tela de edição da temperatura [1 = “Next” (Avançar)].

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

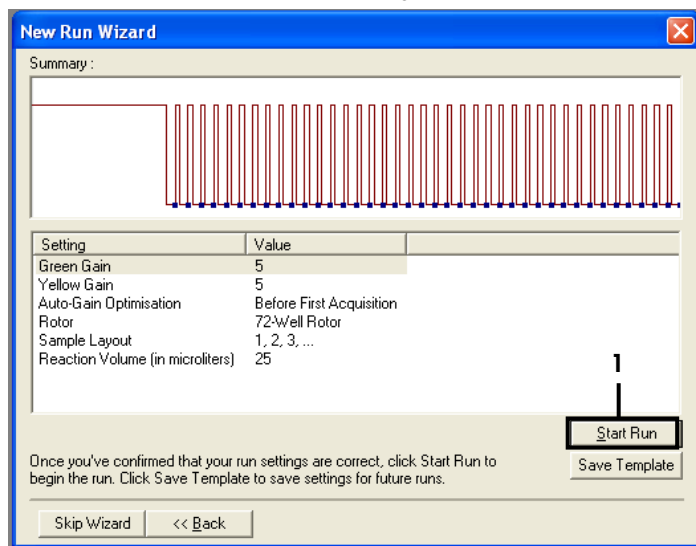


Figura 36. A caixa de diálogo do “New Run Wizard” (Assistente de nova execução) e a tela de resumo [1 = “Start Run” (Iniciar execução)].

6. Depois de iniciar a execução, uma nova janela é exibida. É possível inserir os nomes das amostras, ou clicar em “Finish” (Concluir) e inserir os nomes mais tarde selecionando “Sample” (Amostra) durante a execução ou quando a execução estiver concluída.
7. Se você clicar em “Finish and Lock Samples” (Concluir e bloquear amostras), impedirá a edição dos nomes das amostras. O usuário deve ter muito cuidado ao inserir os nomes das amostras, para assegurar testes e análises corretos.

Nota: quando você inserir nomes de amostras, os campos de tubos vazios devem ficar em branco na coluna “Name” (Nome).

8. Depois de terminar a execução, analise os dados de acordo com as seções “Análise de dados de avaliação de amostras”, na página 90 ou “Análise de dados de detecção de mutação EGFR”, na página 92, conforme o caso.
9. Se você pretender relatórios de quantificação, clique no ícone “Reports” (Relatórios) da barra de ferramentas no arquivo de execução do Rotor-Gene Q.

10.No navegador de relatórios, clique em “Cycling A. Green (Page 1)” (Ciclagem A. Verde) (Página 1) em “Report Categories” (Categorias de relatórios) (Figura 37).

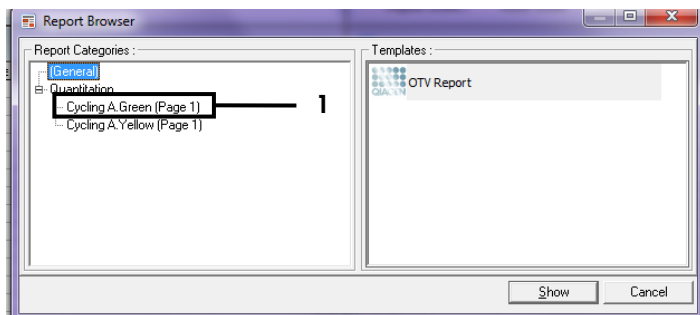


Figura 37. Navegador de relatórios [1 = “Cycling A. Green (Page 1)” (Ciclagem A. Verde) (Página 1)].

11.Selecione “Quantitation (Full Report)” [Quantificação (relatório completo)] na caixa “Templates” (Modelos) (Figura 38).

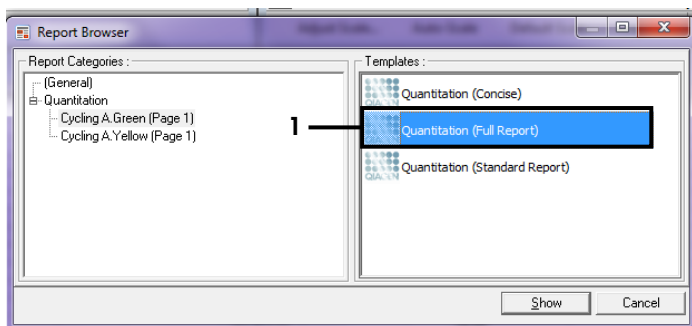


Figura 38. Seleção do relatório “Quantitation (Full Report)” [Quantificação (relatório completo)] (1).

12.Clique em “Show” (Mostrar) para gerar o relatório.

13.Clique em “Save As” (Salvar como) para salvar uma versão eletrônica.

14.Repita para “Cycling A. Yellow (Page 1)” [Ciclagem A. Amarelo (Página 1)].

Interpretação de resultados (Manual)

Depois de terminar a execução do Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (para avaliação de amostras de DNA ou para análise de mutação EGFR) analise os dados de acordo com o procedimento seguinte:

- Configurações de software para análises
- Análise de avaliação de amostras de DNA (manual)
Nota: veja a Tabela 4, na página 25, para a configuração do tubo
- Análise de detecção de mutação EGFR (manual)
Nota: veja a Tabela 7, na página 38, para a configuração do tubo

Configurações de análise do software

1. Abra o arquivo de execução adequado (*.rex) utilizando o software do Rotor-Gene Q, versão série 2.3.
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 dos tubos vazios.
4. Clique em "Analyse" (Análise). Na página de análise, clique em "Cycling A. Yellow" (Ciclagem A. Amarelo) para verificar o canal amarelo (HEX).
5. Clique em "Named On" (Denominado em).
Nota: isto garante que os tubos vazios não fazem parte da análise.
6. Selecione "Dynamic tube" (Tubo dinâmico).
7. Selecione "Slope correct" (Declive correto).
8. Selecione "Linear scale" (Escala linear).

9. Selecione "Take Off Adj." (Ajuste de remoção) e insira os valores 15,01 na caixa superior ["If take off point was calculated before cycle" (Se o ponto de remoção foi calculado antes do ciclo)] e 20,01 na caixa inferior ["then use the following cycle and take off point" (depois utilize o ciclo seguinte e o ponto de remoção)].
10. Configure o limiar como 0,02 e verifique os valores de C_T do canal amarelo (HEX).
11. Na página de análise, clique em "Cycling A. Green" (Ciclagem A. Verde) para visualizar o canal verde (FAM).
12. Selecione "Named On" (Denominado em).
13. Selecione "Dynamic tube" (Tubo dinâmico).
14. Selecione "Slope correct" (Declive correto).
15. Selecione "Linear scale" (Escala linear).
16. Selecione "Take Off Adj." (Ajuste de remoção) e insira os valores 15,01 na caixa superior ["If take off point was calculated before cycle" (Se o ponto de remoção foi calculado antes do ciclo)] e 20,01 na caixa inferior ["then use the following cycle and take off point" (depois utilize o ciclo seguinte e o ponto de remoção)].
17. Configure o limiar como 0,075 e verifique os valores de C_T do canal verde (FAM).

Análise de dados de avaliação de amostras

Depois de terminar a execução de avaliação de amostras de DNA, veja "Configurações de análise do software", na página 89 e analise os dados da seguinte forma. (Veja a Tabela 4, na página 25, para a configuração do tubo).

Executar análise de controle

Controle negativo

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

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

Controle positivo

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

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

Análise de amostras

Se os controles da execução de avaliação de amostras de DNA forem válidos, então a análise pode prosseguir. O valor do C_T do controle de uma amostra deve manter-se na faixa de 23,70 e 31,10 no canal verde (FAM). Se o C_T da amostra ficar fora desta faixa, é exibido o seguinte:

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

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

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

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

Análise de dados de detecção de mutação EGFR

Uma amostra tem que ser aprovada na avaliação de amostras de DNA para poder ser testada para detecção de mutações EGFR (veja “Análise de dados de avaliação de amostras”, na página 90).

Depois de terminar a execução de detecção de mutações EGFR, veja “Configurações de análise do software”, na página 89 e analise os dados da seguinte forma. (Veja a Tabela 7, na página 38, para a configuração do tubo).

Executar análise de controle

Veja o diagrama da análise de controle da execução, na Figura 39.

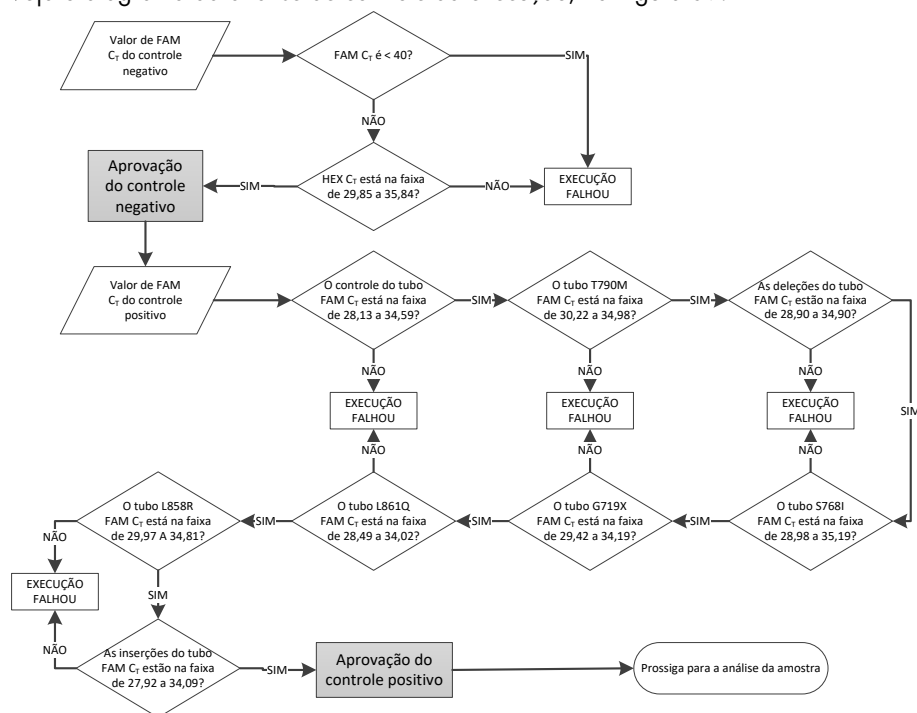


Figura 39. Diagrama de execução de análise de controle para detecção de mutação EGFR.

Controle negativo

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

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

Controle positivo

Para cada ensaio de mutação EGFR, o PC do EGFR tem de exibir um valor de C_T no canal verde (FAM) dentro da faixa indicada na Tabela 16. Um valor fora desta faixa indica um problema na configuração do ensaio. A execução falhou.

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

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

Mistura de reação	Amostra	Canal	Faixa C_T
Controle	PC	Verde	28,13–34,59
T790M	PC	Verde	30,22–34,98
Deleções	PC	Verde	28,90–34,90
L858R	PC	Verde	29,97–34,81
L861Q	PC	Verde	28,49–34,02
G719X	PC	Verde	29,42–34,19
S768I	PC	Verde	28,98–35,19
Inserções	PC	Verde	27,92–34,09

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

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

O valor C_T de controle para uma amostra no canal verde (FAM) deve manter-se dentro da faixa de 23,70 a 31,10. (Veja a Tabela 7, na página 39, para a configuração do tubo).

Se o C_T do controle da amostra ficar fora desta faixa, é exibido o seguinte:

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

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

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

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

Veja o diagrama de análise de amostra para detecção de mutação EGFR, na Figura 40.

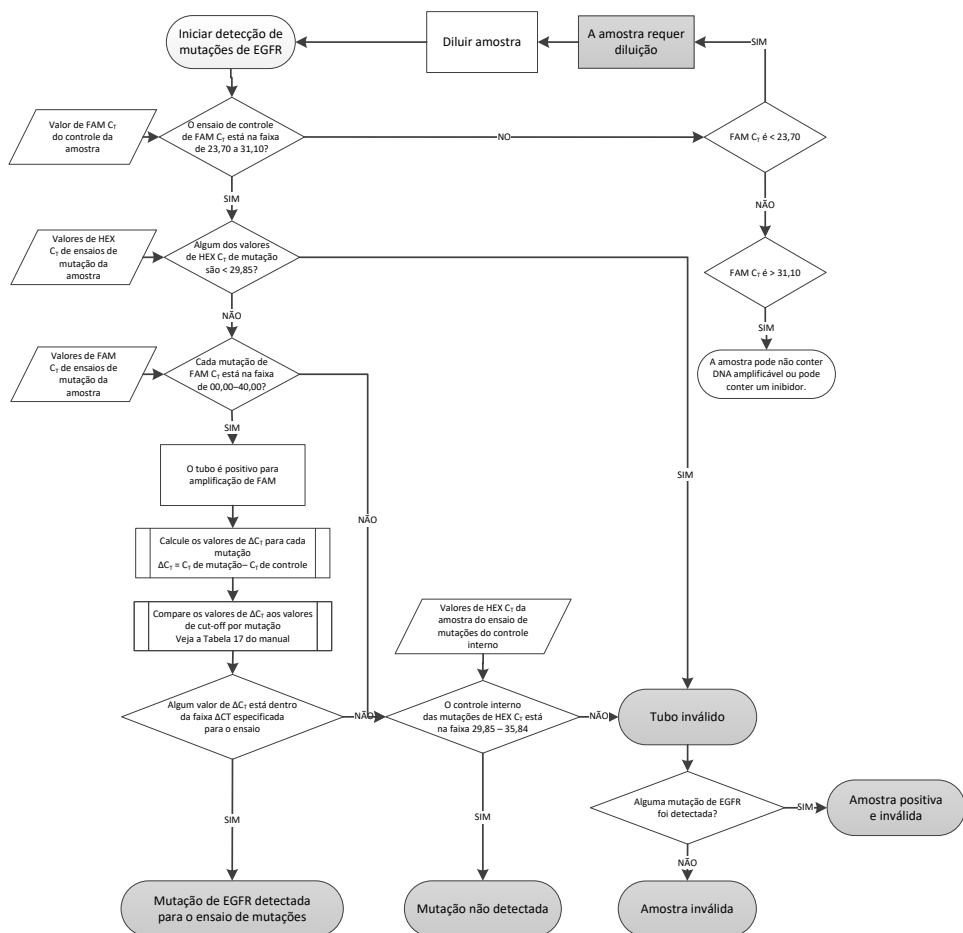


Figura 40. Diagrama de análise de amostra para detecção de mutação EGFR.

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

Veja o diagrama de análise de amostra para detecção de mutação EGFR, na Figura 40.

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

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

Se houver amplificação no canal verde (FAM) e o ΔC_T para essa reação for inferior ou igual ao cut-off do ensaio para esse tubo, a amplificação do canal amarelo (HEX) é válida. Se não houver amplificação no canal verde (FAM) para o tubo ou um valor ΔC_T superior ao cut-off do ensaio, a amplificação do canal amarelo (HEX) é inválida.

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

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

Os valores do canal verde (FAM) de todas as 7 misturas de reação de mutação EGFR devem ser comparados aos valores apresentados na Tabela 17. Os valores especificados estão dentro e incluem os valores apresentados. (Veja a Tabela 7, na página 38, para a configuração do tubo).

Tabela 17. Valores aceitáveis de reações de mutações EGFR de amostras no canal verde (FAM) (ensaio de detecção de mutações EGFR)

Ensaio	Faixa C _T	Cut-off (ΔC _T)
T790M	0,00–40,00	≤ 7,40
Deleções	0,00–40,00	≤ 8,00
L858R	0,00–40,00	≤ 8,90
L861Q	0,00–40,00	≤ 8,90
G719X	0,00–40,00	≤ 8,90
S768I	0,00–40,00	≤ 8,90
Inserções	0,00–40,00	≤ 8,00

- Se o C_T do canal verde (FAM) da amostra ficar dentro da faixa especificada, é observada amplificação FAM positiva.
- Se o C_T do canal verde (FAM) da amostra ficar acima da faixa especificada, ou se não ocorrer amplificação, é observada amplificação FAM negativa.

Conforme indicado abaixo, calcule o valor ΔC_T de cada tubo de detecção de mutação EGFR que apresente amplificação FAM positiva, certificando-se de que os valores C_T de mutação e de controle são da mesma amostra. (Veja a Tabela 7, na página 38, para a configuração do tubo).

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

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

O ponto de cut-off é o ponto acima do qual poderá potencialmente existir um sinal positivo de um ensaio devido ao sinal de fundo do iniciador ARMS no DNA de tipo selvagem. Se o valor ΔC_T da amostra for superior ao ponto de cut-off de um ensaio, a amostra é classificada como negativa ou para além dos limites de detecção do Kit para esse ensaio.

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

- Mutação detectada
- Mutação não detectada
- Inválido

Mutação detectada

A amplificação do canal verde (FAM) é positiva e o valor de ΔC_T é igual ou inferior ao valor de cut-off. Se várias mutações forem detectadas em uma amostra, todas elas podem ser relatadas.

Mutação não detectada

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

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

Inválido

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

A amplificação do canal verde (FAM) é negativa e a amplificação do canal amarelo (HEX) (controle interno) é negativa.

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

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

O Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR foi concebido para ser utilizado com o equipamento Rotor-Gene Q MDx e um rotor de 72 poços. O *therascreen* EGFR CE Assay Package está disponível por separado em um CD (ref.º 9023537). O pacote de ensaios engloba o “*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template” e o “*therascreen* EGFR CE Locked Template”.

Nota: o *therascreen* EGFR CE Assay Package só é compatível com o software Rotor Gene Q, versão 2.3. Antes de proceder à instalação do *therascreen* EGFR CE Assay Package, certifique-se de que a versão correta do software Rotor Gene Q está instalada. Se o seu equipamento Rotor-Gene Q MDx foi fornecido com uma versão de software anterior, atualize o software fazendo download do software Rotor Gene Q versão 2.3, disponível na página do produto Rotor-Gene Q MDx, na seção “Product Resources” (Recursos do produto) em “Operating Software” (Software de operação) em www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources.

Procedimento

1. Encomende o CD do *therascreen* EGFR CE Assay Package (ref.º 9023537).
2. Insira o CD na unidade de CD do computador conectado ao equipamento Rotor-Gene Q MDx.
3. Se o CD carregar automaticamente, inicie a instalação clicando duas vezes no arquivo “*therascreen*_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe”.
Alternativamente, localize e inicie este arquivo executável utilizando o navegador de arquivos do computador conectado.
4. O assistente de instalação do *therascreen* EGFR CE Assay Package abre. Clique em “Next” (Avançar) para continuar (Figura 41).

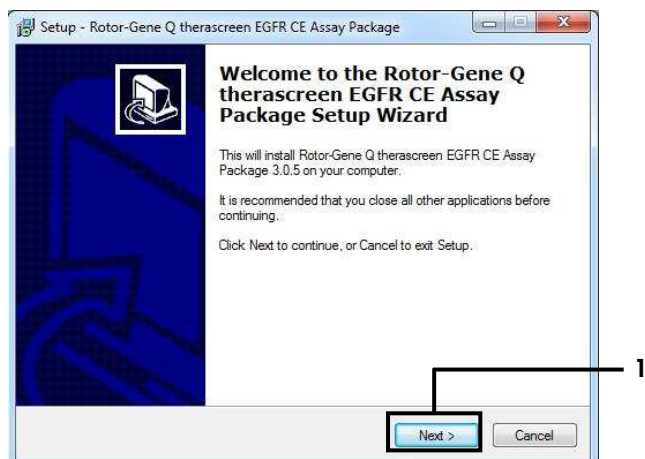


Figura 41. A caixa de diálogo "Setup Wizard" (Assistente de instalação) [1 = "Next" (Avançar)].

5. Leia o Contrato de Licença na caixa de diálogo e aceite o contrato selecionando a opção "I accept the agreement" (Aceito o contrato). Clique em "Next" (Avançar) para continuar (Figura 42).

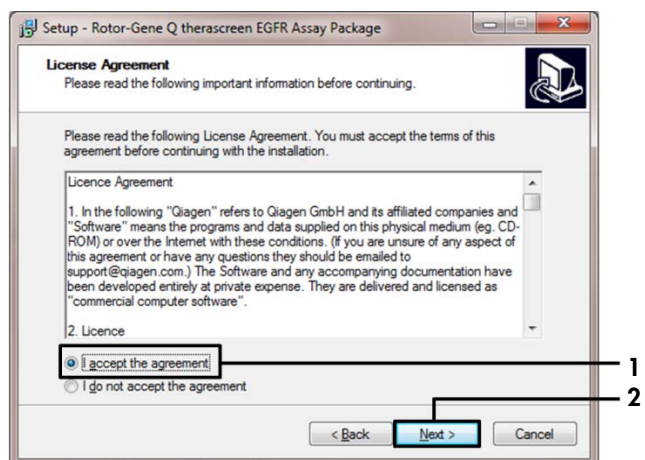


Figura 42. A caixa de diálogo "License Agreement" (Contrato de Licença). 1 = "I accept the agreement" (Aceito o acordo); 2 = "Next" (Avançar).

6. A instalação é iniciada automaticamente. Depois de terminar a instalação, uma caixa de diálogo final do “Setup Wizard” (Assistente de instalação) abre. Clique em “Finish” (Concluir) para sair do assistente (Figura 43).

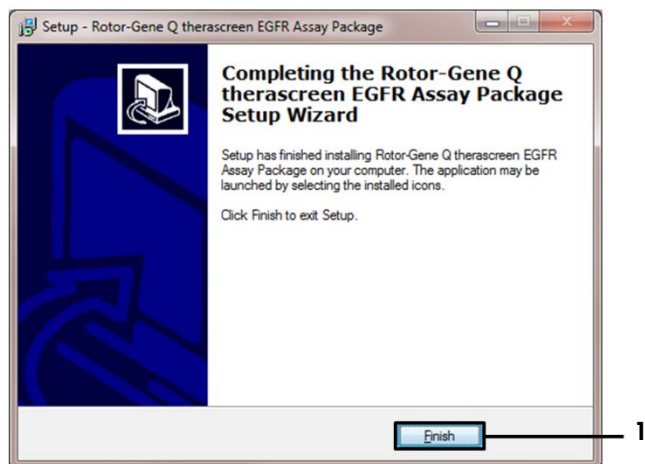


Figura 43. Concluindo o assistente de instalação [(1 = “Finish” (Concluir))].

7. Reinicie o computador.

Atalhos são gerados automaticamente para o “therascreen EGFR CE Control Run Locked Template” e o “therascreen EGFR CE Locked Template”, que são exibidos na área de trabalho (Figura 44).

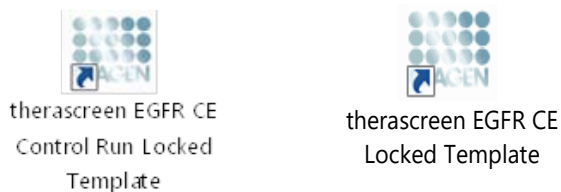


Figura 44. Ícones do EGFR CE Control Run Locked Template e EGFR CE Locked Template

Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de suporte técnico em **www.qiagen.com/Support**, ligue 00800-22-44-6000 ou entre em contato com um dos Departamentos de serviço técnico da QIAGEN ou distribuidores locais (consulte o verso do manual ou acesse **www.qiagen.com**).

Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Ref.ª
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reações: ensaio de controle, 7 Ensaios de mutação, Controle Positivo, Polimerase <i>Taq</i> de DNA, Água para NTC e Água para Diluição de Amostras	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD	Pacote de software de protocolo para utilização com o Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR e o equipamento QIAGEN Rotor-Gene Q MDx	9023537
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparações de DNA: colunas QIAamp MinElute®, Proteinase K, Tampões e Tubos de coleta (2 mL)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparações: 50 colunas QIAamp MinElute, Proteinase K, Tampões e Tubos de coleta (2 mL)	56404
Rotor-Gene Q MDx 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 treinamento	9002033

Produto	Conteúdo	Ref.ª
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de Fusão de Alta Resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal HRM, computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia das peças e do serviço da assistência; instalação e treinamento não incluídos	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração manual da reação com pipeta de um canal em 72 tubos de 0,1 mL	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reações	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10.000 reações	981106

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

Histórico de revisão do Manual

Documento	Alterações	Data
HB-1909-002	Atualização dos valores do LOD (Tabela 11) em "Características de desempenho".	Junho 2015
HB-1909-003	Atualizações dos alarmes do software de ensaio (Tabela 8). Atualizações dos dados de reprodutibilidade do ensaio (Tabela 12). Adição de dados de resultados clínicos para IRESSA em "Características de desempenho".	Agosto 2016
HB-1909-004	Alteração da configuração dos tempos de armazenamento para esclarecer o tempo de descongelamento e o tempo total em "Condições de armazenamento" e nas Tabelas 2 e 5. Atualização da Figura 40. Diagrama de análise de amostra para detecção de mutação EGFR. Informações para pedidos adicionadas para o Kit QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue (nº de ref.º 60404)	Março de 2018
HB-1909-005	Adição de Representante autorizado (capa). Seção "Símbolos" atualizada.	Janeiro de 2019

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (Grupo QIAGEN); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); GIOTRIF® (Boehringer Ingelheim), IRESSA® (Grupo AstraZeneca)

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

Contrato de licença exclusiva para o Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

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

1. O produto só pode ser usado conforme os protocolos facultados com o mesmo e este manual e apenas com componentes contidos no painel. A QIAGEN não concede licença a qualquer uma de suas propriedades intelectuais para usar ou incorporar os componentes incluídos neste painel com quaisquer componentes não incluídos no mesmo, exceto conforme descrito nos protocolos facultados com o produto, neste manual e nos protocolos adicionais, disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infringem os direitos de terceiros.
2. A não ser em relação às licenças expressamente indicadas, a QIAGEN não garante que este painel e/ou seu(s) uso(s) não infringem os direitos de terceiros.
3. Este painel e seus componentes estão licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN especificamente renuncia a quaisquer outras licenças, indicadas ou embutidas, a não ser àquelas expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do painel concordam em não realizar nenhuma etapa, nem permitir que outra pessoa o faça, que possa levar a ou facilitar quaisquer dos atos proibidos acima. A QIAGEN poderá executar as proibições desse Acordo de licença limitado em qualquer Tribunal. Também deverá recuperar todos os custos da investigação e relativos ao Tribunal, incluindo os encargos dos advogados, em qualquer ação para executar o Acordo de licença limitado ou quaisquer direitos de propriedade intelectual relacionados ao kit e/ou seus componentes.

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

HB-1909-005 01-2019 © 2019 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Notas

Pedido www.qiagen.com/shop | Assistência Técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com