



Junio de 2022

Instrucciones de uso de *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Versión 1

IVD

Para uso diagnóstico in vitro

Para su uso con los equipos Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE

REF

870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R6 **MAT**

1127512ES

Contenido

Uso previsto	5
Resumen y explicación	6
Principio del procedimiento	7
Formato del kit	7
Ensayos.....	8
Controles.....	9
Materiales suministrados	10
Contenido del kit.....	10
Materiales requeridos pero no suministrados	11
Advertencias y precauciones.....	12
Información de seguridad.....	12
Precauciones generales.....	12
Almacenamiento y manipulación de reactivos.....	14
Manipulación y almacenamiento de material de muestra	16
Procedimiento	17
Protocolo: detección de mutaciones de EGFR.....	18
Protocolo: configuración del equipo Rotor-Gene Q EGFR.....	23
Análisis de los datos de valoración de las mutaciones	30
Guía para la resolución de problemas	38
Control de calidad.....	40
Limitaciones	40
Características del rendimiento	42

Sensibilidad analítica: límite de blanco (Limit of Blank, LOB)	42
Límite de detección (Limit of Detection, LOD).....	42
Sensibilidad analítica: valores de corte de ΔC_T e intervalo de corte de ΔC_T	44
Repetibilidad y reproducibilidad	44
Efecto del ADN introducido sobre los valores de C_T	45
Sustancias interferentes	45
Rendimiento clínico	49
Referencias	50
Información de contacto	51
Símbolos	52
Apéndice A: detalles de mutación	54
Información para pedidos	55
Historial de revisiones del documento	57

Uso previsto

El *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la detección de deleciones del exón 19, sustituciones de los exones 20 y 21 (T790M y L858R, respectivamente) en el gen que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) y para la obtención de una valoración cualitativa del estado de mutación. Los resultados tienen como objetivo ayudar al personal médico a identificar pacientes con NSCLC que puedan beneficiarse de un tratamiento con IRESSA® (gefitinib), cuando no es posible realizar la evaluación con una muestra de tejido.

El *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit está concebido para el uso por parte de personal cualificado en entornos profesionales de laboratorio con muestras de ADN extraídas de plasma obtenido de sangre de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

El *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit está diseñado para el uso en diagnóstico *in vitro*.

Resumen y explicación

El *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit es un equipo listo para utilizar que se ha diseñado para la detección de mutaciones en el gen EGFR relacionado con el cáncer, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) en equipos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Con ayuda de las tecnologías Scorpions® y ARMS, el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit permite detectar las siguientes mutaciones del gen EGFR en un fondo de ADN genómico nativo.

- Deleciones en el exón 19
- T790M
- L858R

Los métodos que se utilizan en este kit son altamente selectivos y, en función del volumen total de ADN presente, permiten detectar un bajo porcentaje de mutaciones en un fondo de ADN genómico nativo. Los límites de selectividad y detección son superiores a los de otras tecnologías como la de secuenciación mediante terminadores fluorescentes.

Principio del procedimiento

El *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit combina dos tecnologías (ARMS y Scorpions) para detectar mutaciones durante una real-time PCR.

ARMS

La tecnología ARMS permite llevar a cabo una amplificación específica de los alelos o las mutaciones (sistema de mutación refractario a la amplificación). La ADN polimerasa Taq (Taq) resulta eficaz para diferenciar entre una coincidencia y un error de coincidencia en el extremo 3' de un primer de PCR. Algunas secuencias mutadas se amplifican de forma selectiva, incluso en muestras cuya mayoría de secuencias no presenta la mutación. Cuando la coincidencia con el primer es completa, la amplificación se produce con total eficacia. Cuando no hay coincidencia con la base 3', únicamente tiene lugar una amplificación de fondo de nivel bajo.

Scorpions

La detección de la amplificación se realiza mediante la tecnología Scorpions. La tecnología Scorpions utiliza moléculas bifuncionales que contienen un primer de PCR unido covalentemente a una sonda. El fluoróforo de esta sonda interactúa con un quencher o supresor, también incorporado en la sonda, lo que reduce la fluorescencia. Durante la reacción de la PCR, cuando la sonda se une al amplicón, se separan el fluoróforo y el supresor. Esto provoca un aumento de la fluorescencia en el tubo de reacción.

Formato del kit

El *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit se suministra con 4 ensayos:

- Un ensayo de control (Ctrl)
- Tres ensayos de mutación

Todas las mezclas de reacción contienen reactivos para la detección de objetivos marcados con FAM™ y un ensayo de control interno marcado con HEX™. El ensayo de control interno permite detectar la existencia de inhibidores que puedan conducir a resultados de falsos negativos. La amplificación de FAM puede dejar fuera de competencia a la amplificación del control interno y el propósito del control interno es simplemente mostrar que, si no hay amplificación de FAM, el resultado es un negativo auténtico y no una reacción de PCR errónea.

Ensayos

Ensayo de control

El ensayo de control, marcado con FAM, sirve para valorar el ADN total de la muestra. Este ensayo amplifica una región del exón 2 del gen EGFR. Los primers y la sonda están diseñados para evitar cualquier polimorfismo conocido del gen EGFR.

Ensayos de mutación

Cada ensayo de mutación contiene una sonda Scorpions marcada con FAM y un primer ARMS para discriminar entre el ADN nativo y el ADN mutante específico.

Controles

Todas las series experimentales deben utilizar los controles que se indican a continuación:

Control positivo

Cada serie debe contener un control positivo en los tubos del 1 al 4. El *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit contiene control positivo (Positive Control, PC) de EGFR para utilizarlo como molde en la reacción de control positivo. Se evaluarán los resultados de control positivo para garantizar que el kit funciona según los criterios de aceptación indicados.

Control negativo

Cada serie debe contener un control negativo (control sin molde o No-Template Control, NTC) en los tubos del 9 al 12. El NTC está formado por agua exenta de nucleasas (H₂O), que se utiliza como «molde» para el control sin molde. El control sin molde se utiliza para evaluar las posibles contaminaciones durante la configuración de la serie y para evaluar el rendimiento de la reacción de control interno.

Evaluación de la reacción de control interno

Cada mezcla de reacción contiene un control interno, además de la reacción diana. Un error indica que pueden existir inhibidores que podrían derivar en resultados de falsos negativos o bien que se ha producido un error de configuración del usuario para ese tubo.

Si el error del control interno se debe a una inhibición de PCR, diluir la muestra podría reducir el efecto de los inhibidores, pero debe tenerse en cuenta que esto también diluiría el ADN diana. La amplificación de FAM puede desplazar a la amplificación del control interno, por lo que el valor de CT (HEX) del control interno generado podría estar fuera del intervalo especificado. Los resultados de FAM siguen siendo válidos para estas muestras.

Materiales suministrados

Contenido del kit

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
N.º de catálogo			870311
Número de reacciones			24
Rojo	Control Reaction Mix (mezcla de reacción para control)	Ctrl	2 x 600 µl
Morado	T790M Reaction Mix (mezcla de reacción para T790M)	T790M	600 µl
Naranja	Deletions Reaction Mix (mezcla de reacción para deleciones)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (mezcla de reacción para T790M)	L858R	600 µl
Beis	EGFR Positive Control (control positivo de EGFR)	PC	300 µl
Menta	<i>Taq</i> DNA Polymerase (ADN polimerasa <i>Taq</i>)	<i>Taq</i>	2 x 80 µl
Blanco	Nuclease-Free Water for No Template Control (Agua exenta de nucleasas para el control sin molde)	NTC	1 x 1,9 ml
Blanco	Nuclease-Free Water for Dilution (Agua exenta de nucleasas para la dilución)	Dil	1 x 1,9 ml
Instrucciones de uso de <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (manual de uso)			1

Materiales requeridos pero no suministrados

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Kit para extracción de ADN (consulte «Procedimiento», página 17)
- Pipetas exclusivas* (ajustables) para la preparación de muestras
- Pipetas exclusivas* (ajustables) para la preparación de la mezcla maestra para PCR
- Pipetas exclusivas (ajustables) para la dispensación de ADN del molde
- Puntas de pipeta exentas de desoxirribonucleasa, ribonucleasa y ADN con filtros (para evitar la contaminación cruzada, recomendamos puntas de pipeta con filtros para aerosoles)
- Baño de agua o dispositivo similar que permita incluir tubos para centrífuga de 50 ml a una temperatura de 60 °C
- Bloque calefactor o dispositivo similar que permita la incubación a una temperatura de 56 °C†
- Hielo picado
- Centrífuga de mesa* con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Vórtex
- Equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* † con canales de fluorescencia para Cycling Green y Cycling Yellow (detección de FAM y HEX, respectivamente)
- Software Rotor-Gene Q, versión 2.3.5 o superior
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, para uso con un 72-Well Rotor (N.º de cat. 981103 o 981106)
- Tubos de microcentrífuga exentos de desoxirribonucleasa, ribonucleasa y ADN para la preparación de las mezclas maestras
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, bloque de aluminio para la configuración de reacción manual con pipeta de un solo canal (QIAGEN, n.º de catálogo 9018901)

* Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

† En algunos países, si corresponde, se puede utilizar el equipo Rotor-Gene Q 5plex HRM con una fecha de producción de mayo de 2011 o posterior. La fecha de producción se puede obtener del número de serie situado en la parte posterior del equipo. El número de serie presenta el formato «mmaann», donde «mm» indica el mes de producción en dígitos, «aa» indica los dos últimos dígitos del año de producción y «nnn» indica el identificador exclusivo del equipo.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional

Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits de QIAGEN.

Precauciones generales

El usuario debe tener en cuenta siempre las siguientes indicaciones:

- Utilice puntas de pipeta exentas de desoxirribonucleasa, ribonucleasa y ADN con filtros y asegúrese de que las pipetas se han calibrado según las instrucciones del fabricante.
- Almacene y extraiga los materiales positivos (materiales de muestra y controles positivos) por separado de los demás reactivos, y añádalos a la mezcla de reacción en un área separada espacialmente.
- Descongele por completo todos los componentes a temperatura ambiente (15–25 °C) antes de comenzar un ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifúguelos brevemente.

Nota: Extreme la precaución para evitar la contaminación de las reacciones de PCR con material de control sintético. Es recomendable usar pipetas específicas independientes para

preparar las mezclas de reacción y añadir ADN molde. La preparación y dispensación de las mezclas de reacción deben realizarse en una zona distinta a la utilizada para añadir el molde. Los tubos de Rotor-Gene Q no se deben abrir después de haber finalizado la serie de PCR. Con ello, se evita la contaminación del laboratorio con productos posteriores a la PCR.

Nota: Los reactivos están validados para la configuración manual. Si se utiliza un método automatizado, podría reducirse el número de posibles reacciones debido a los reactivos necesarios para rellenar «volúmenes muertos» en estos equipos.

Nota: Todos los reactivos del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit se han formulado específicamente para su uso con las pruebas mencionadas. Todos los reactivos suministrados con el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Para mantener un rendimiento óptimo de los reactivos del kit, no los sustituya.

Nota: Utilice únicamente la ADN polimerasa *Taq* (*Taq*) suministrada con el kit. No la sustituya por ADN polimerasa *Taq* de otros kits del mismo o de otro tipo ni por ADN polimerasa *Taq* de otro fabricante.

Nota: Los reactivos del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit presentan una dilución óptima. No se recomienda una mayor dilución de los reactivos puesto que estos podrían perder eficacia. No se recomienda utilizar volúmenes de reacción inferiores a 25 µl puesto que su uso aumenta el riesgo de falsos negativos.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

El *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit se suministra en hielo seco. Si alguno de los componentes del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit no está congelado a la llegada, si el embalaje externo se ha abierto durante el transporte o si el envío no incluye la nota de embalaje, las instrucciones de uso o los reactivos, póngase en contacto con los departamentos del servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (visite www.qiagen.com).

Una vez recibido, almacene inmediatamente el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit en un congelador a una temperatura constante de entre -30 °C y -15 °C y protéjalo de la luz. Si se almacena en las condiciones especificadas, el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

Una vez abiertos, los reactivos deben almacenarse en el embalaje original a una temperatura comprendida entre -30 °C y -15 °C durante 12 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en el embalaje, el periodo que transcurra primero. No es aconsejable descongelarlo y volver luego a congelarlo. No exceda el máximo de ocho ciclos de congelación-descongelación.

Los reactivos deben descongelarse a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 4,5 horas. Cuando los reactivos están listos para utilizarse, pueden configurarse las reacciones de PCR y los tubos de Rotor-Gene Q, que contienen las mezclas maestras y la muestra de ADN, deben cargarse en el Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM inmediatamente. El tiempo total desde el inicio de la configuración de la PCR hasta el inicio de la serie no debe superar:

- 6 horas si se almacenan a temperatura ambiente
Nota: Este tiempo incluye tanto la configuración de la PCR como el almacenamiento.
- 18 horas si se almacenan en un refrigerador ($2-8\text{ °C}$)
Nota: Este tiempo incluye tanto la configuración de la PCR como el almacenamiento.

Nota: Los primers Scorpions (como todas las moléculas marcadas con fluorescencia) incluidos en los reactivos de la mezcla de reacción son muy sensibles a la luz. Proteja los reactivos de control y de la mezcla de reacción de la luz para evitar el blanqueamiento.

Los reactivos del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ofrecen una dilución óptima, por lo que no es necesario realizar más purificaciones ni ningún otro tratamiento antes de utilizarlos para el análisis según las indicaciones de las *Instrucciones de uso (Manual) del theascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit*.

Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad y las condiciones de almacenamiento impresas en las cajas y etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados o mal almacenados.

Manipulación y almacenamiento de material de muestra

Nota: Todas las muestras deben tratarse como material potencialmente infeccioso.

El material de las muestras debe ser ADN genómico humano obtenido de plasma. Los materiales de muestra se deben transportar de acuerdo con la metodología anatomopatológica estándar para garantizar la calidad del material de muestra.

Procedimiento

Extracción de ADN

Las características de rendimiento de este kit se han determinado mediante ADN extraído con el QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (n.º de catálogo 55114). Si se utiliza el QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, lleve a cabo la extracción del ADN de acuerdo con las instrucciones del manual y tenga en cuenta las recomendaciones siguientes:

- El volumen inicial de plasma es de 2 ml.
- Antes de realizar la extracción de ADN, es necesario centrifugar 2 ml de plasma a 3000 rpm durante 2 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- El volumen de proteinasa K debe ser de 250 µl.
- La digestión de la proteinasa K debe realizarse durante 1 hora a una temperatura de 60 °C.
- El ADN genómico purificado debe eluirse en 55 µl de Buffer AVE (suministrado en el QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Almacene el ADN genómico purificado a una temperatura de entre -30 °C y -15 °C.

Nota: Todos los ensayos del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit generan productos de PCR cortos. Sin embargo, el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit no funciona correctamente con un ADN excesivamente fragmentado.

Protocolo: detección de mutaciones de EGFR

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Para obtener resultados correctos, asegúrese de realizar el procedimiento de mezcla descrito en cada paso de mezcla del proceso de configuración del ensayo.
- Pueden analizarse hasta 16 muestras en cada ciclo.
- Antes de comenzar el procedimiento, lea el apartado «Precauciones generales», en la página 12.
- Tómese tiempo para familiarizarse con el Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM antes de iniciar el protocolo. Lea el manual del usuario del equipo.
- No mezcle en vórtex la ADN polimerasa *Taq* (*Taq*) ni ninguna otra mezcla que contenga ADN polimerasa *Taq*, ya que esto inactivaría la enzima.
- Pipetee la enzima *Taq*. Para ello, introduzca con cuidado la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra de enzima en exceso.
- Para cada muestra de ADN, los ensayos de control y de mutación deben analizarse en la misma serie de PCR, a fin de evitar variaciones entre series analíticas.
- Para garantizar un uso eficiente de los reactivos del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, agrupe las muestras de ADN en lotes en la medida de lo posible para obtener series analíticas completas. Analizar las muestras de forma individual o por grupos más reducidos supone un mayor consumo de reactivos y reduce el número total de muestras que se pueden analizar con un único *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Antes de comenzar

- Antes de cada uso, descongele por completo todos los reactivos durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 4,5 horas a temperatura ambiente (15-25 °C), mézclelos invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifúguelos brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo.

- Asegúrese de que la enzima *Taq* se encuentra a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de cada uso. Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.
- Mezcle todas las muestras invirtiéndolas 10 veces y centrifugue brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo.

Procedimiento

1. Descongele totalmente todas las mezclas de reacción, el agua exenta de nucleasas para el control sin molde (No-Template Control, NTC) y el control positivo (Positive Control, PC) de EGFR a temperatura ambiente (15-25 °C) durante al menos 1 hora (Tabla 1). Cuando se hayan descongelado los reactivos, mézclelos invirtiéndolo cada tubo 10 veces para evitar concentraciones localizadas de sales. A continuación, centrifúguelos brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo.

Tabla 1. Tiempos de descongelación, tiempos de configuración de la PCR y temperaturas de almacenamiento

Tiempo de descongelación mínimo	Tiempo de descongelación máximo	Temp. almac. posterior a config. de PCR	Tiempo máximo config. de PCR y almacenamiento
1 hora	4,5 horas	Temperatura ambiente (15-25 °C)	6 horas
1 hora	4,5 horas	2-8 °C	18 horas

Nota: La configuración de la PCR debe realizarse a temperatura ambiente. Por «almacenamiento» se entiende el tiempo transcurrido entre la finalización de la configuración de la PCR y el inicio de la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Nota: Lleve la ADN polimerasa *Taq* (tubo para *Taq*) a temperatura ambiente (15-25 °C) a la vez que los otros reactivos (consulte el apartado «Almacenamiento y manipulación de reactivos», la página 14). Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

2. Realice los siguientes pasos:

- 2a. Etiquete cuatro tubos para microcentrifuga (no suministrados) de acuerdo con las mezclas de reacción correspondientes indicadas en la tabla 2.
- 2b. Prepare suficientes mezclas maestras (mezcla de reacción para control o mutación [tubo para CTRL, T790M, deleciones y L858R] más ADN polimerasa *Taq* [*Taq*]) para las muestras de ADN, una reacción para control positivo (tubo para PC) de EGFR y agua exenta de nucleasas como reacción para control sin molde (tubo para NTC), según los volúmenes indicados en la tabla 2.

Nota: Incluya reactivos para una muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR.

Las mezclas maestras contienen todos los componentes necesarios para la PCR excepto la muestra.

Tabla 2. Preparación de las mezclas maestras*

Ensayo	Tubo para mezcla de reacción	Volumen de mezcla de reacción	Volumen de ADN polimerasa <i>Taq</i> (tubo para <i>Taq</i>)
Control	CTRL	19,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
T790M	T790M	19,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
Deleciones	Del	19,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
L858R	L858R	19,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$

* Cuando prepare la mezcla maestra, prepare una cantidad suficiente para una muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR.

Nota: Cuando prepare la mezcla maestra, añada al tubo correspondiente primero el volumen necesario de mezcla de reacción para control o mutación y, por último, la ADN polimerasa *Taq*.

3. Coloque el número adecuado de tiras de 4 tubos para PCR (cada tira consta de 4 tubos) en el bloque de carga según la disposición de la tabla 3. No tape los tubos.

Nota: Deposite los tapones en el contenedor de plástico hasta que los necesite.

4. Tape el tubo de la mezcla maestra e inviértalo 10 veces para mezclar la mezcla maestra. A continuación, centrifúguelo brevemente para asegurarse de que la mezcla se encuentre en el fondo del tubo. Añada inmediatamente 20 µl de la mezcla maestra en cada una de las tiras de tubos para PCR correspondiente.
5. Añada inmediatamente 5 µl de agua exenta de nucleasas (H₂O) a los tubos de tiras de PCR de control sin molde (números de los tubos de PCR del 9 al 12) y tape los tubos.
6. Añada 5 µl de cada muestra a los tubos de muestra (tubos para PCR del 5 al 8, del 13 al 16 y del 17 al 72) y tape los tubos.
7. Añada 5 µl de control positivo (Positive Control, PC) de EGFR a los tubos de control positivo (números de los tubos de PCR del 1 al 4). Cada muestra de ADN se debe analizar con el ensayo de control y con todos los ensayos de mutación. La disposición se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Disposición de los ensayos de control y mutación

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

8. Con un rotulador permanente, marque los tapones de los primeros tubos de cada tira de 4 tubos para PCR en la posición numérica más baja (p. ej., posiciones 1, 5 y 9, etc.) para marcar la orientación de carga de los tubos en el rotor de 72 pocillos del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Invierta 4 veces los tubos tapados para mezclar la muestra y la mezcla de reacción.
10. Coloque todas las tiras de 4 tubos para PCR en las posiciones apropiadas del rotor de 72 pocillos y compruebe visualmente que todos los tubos contienen un volumen idéntico.
Nota: Asegúrese de que las tiras de los tubos no están al revés cuando las transfiera al rotor.
11. Si el rotor no está lleno, rellene los espacios restantes con tubos vacíos tapados.
12. Coloque inmediatamente el rotor en el Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Asegúrese de que el anillo de bloqueo (accesorio del equipo Rotor-Gene Q MDx) se encuentra en la parte superior del rotor para asegurar los tubos durante la serie.
13. Consulte la configuración del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (consulte «Protocolo: configuración del equipo Rotor-Gene Q EGFR», en la página 23) para crear el perfil de temperatura e iniciar la serie.

Protocolo: configuración del equipo Rotor-Gene Q EGFR

Los parámetros de ciclo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de ciclado

Ciclos	Temperatura	Hora	Adquisición de datos
1	95 °C	15 minutos	Ninguna
40	95 °C	30 segundos	Ninguna
	60 °C	60 segundos	Green y Yellow

1. Haga doble clic en el icono del software Rotor-Gene Q Series Software 2.3 en el escritorio del ordenador portátil conectado al Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Seleccione la pestaña «Advanced» (Avanzado) dentro del cuadro de diálogo «New Run» (Nueva serie) que se muestra.
2. Para crear un nuevo molde, seleccione Empty Run (Serie vacía) y haga clic en New (Nueva).
Aparece la ventana «New Run Wizard» (Asistente para series nuevas).
3. Seleccione 72-Well Rotor (Rotor de 72 pocillos) como tipo de rotor. Confirme que el anillo de bloqueo esté sujeto y marque la casilla Locking Ring Attached (Anillo de fijación sujeto). Haga clic en Next (Siguiete) (Figura 1).

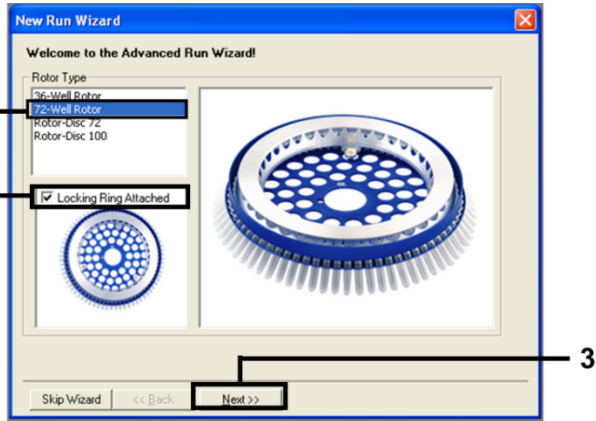


Figura 1. Cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas).

4. Introduzca el nombre del operador en el campo Operator (Operador). Añada notas y establezca el valor 25 en el campo Reaction Volume (Volumen de reacción). Asegúrese de que los valores del campo Sample Layout (Disposición de muestras) sean 1, 2, 3.... Haga clic en Next (Siguiete) (Figura 2).

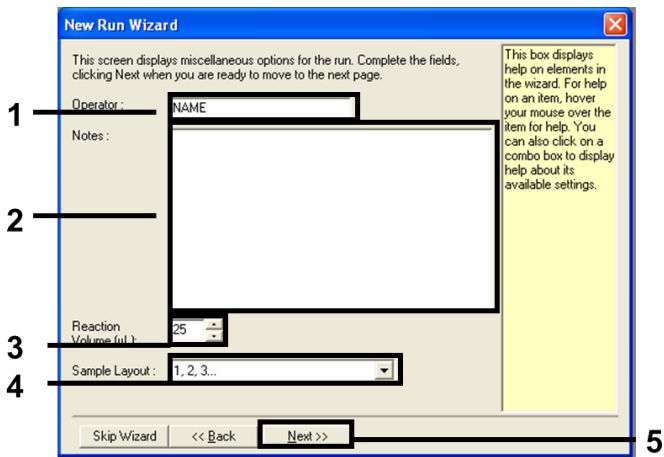


Figura 2. Introducción del nombre del usuario y los volúmenes de reacción.

5. Haga clic en Edit Profile (Editar perfil) situado en el cuadro de diálogo «New Run Wizard» (Asistente para series nuevas) (figura 3) y defina los parámetros de la serie analítica según los pasos siguientes.

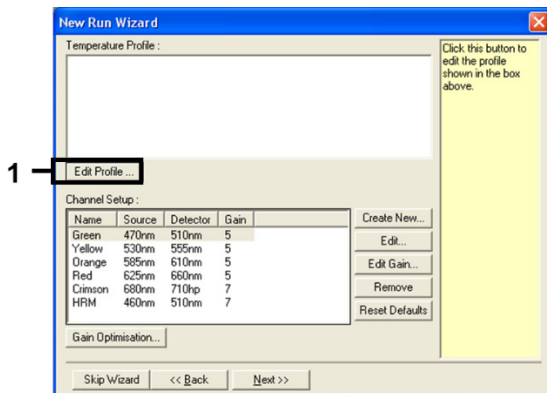


Figura 3. Edición del perfil.

6. Haga clic en Insert after (Insertar después) y seleccione New Hold at Temperature (Nueva fase de temperatura) (figura 4).

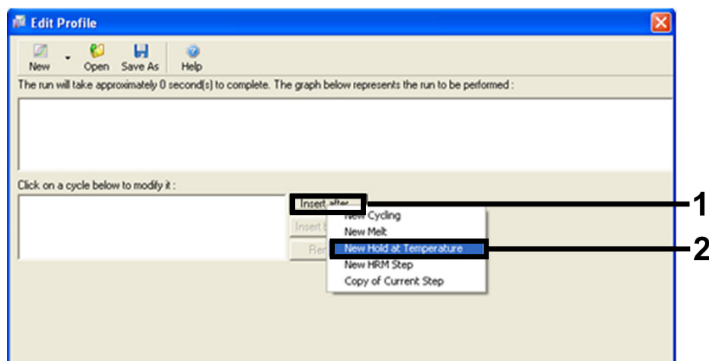


Figura 4. Inserción de un paso de incubación inicial.

7. Establezca el valor en el campo Hold Temperature (Mantener temperatura) en 95 °C y el valor en el campo Hold Time (Tiempo de retención) en 15 mins 0 secs (15 min 0 s). Haga clic en Insert After (Insertar después) y seleccione New Cycling (Ciclos nuevos) (Figura 5).

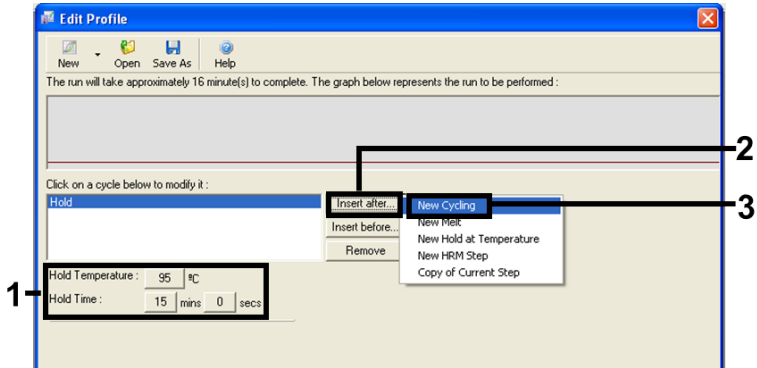


Figura 5. Paso de incubación inicial a 95 °C.

8. Ajuste el número de repeticiones de ciclo en 40. Seleccione el primer paso y establezca el valor en 95 °C durante 30 segundos (Figura 6).

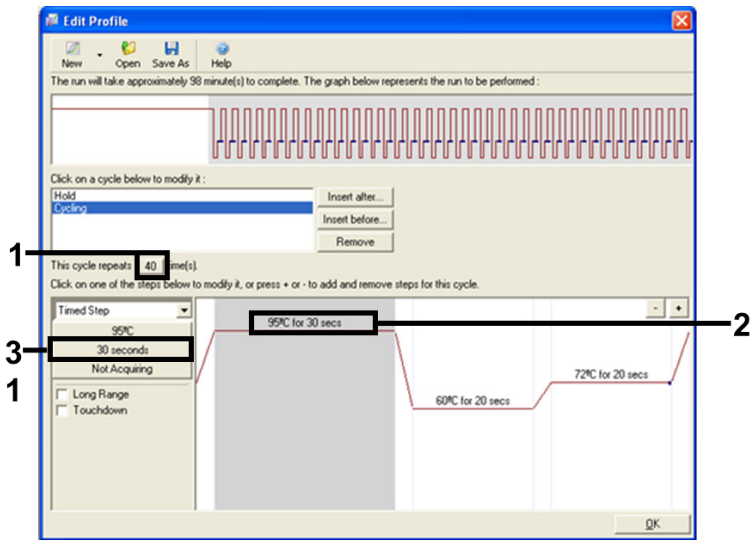


Figura 6. Paso de ciclado a 95 °C.

9. Seleccione el segundo paso y establezca el valor en 60 °C durante 60 segundos. Haga clic en Not Acquiring (No adquirir) para activar la adquisición de datos durante este paso. (Figura 7).

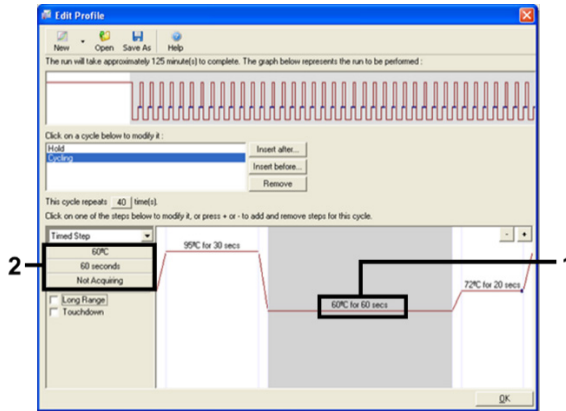


Figura 7. Paso de ciclado a 60 °C.

10. Seleccione Green y Yellow en la lista Available Channels (Canales disponibles) y, a continuación, haga clic en > para transferirlos a la lista Acquiring Channels (Canales de adquisición). Haga clic en OK (Aceptar) (Figura 8).

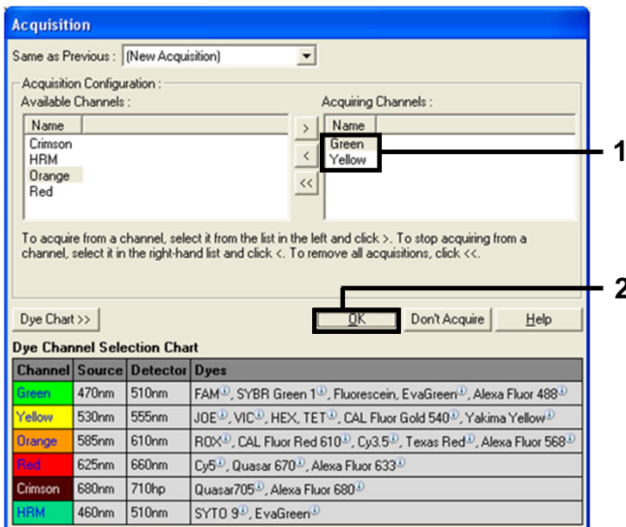


Figura 8. Adquisición en el paso de ciclado a 60 °C.

11. Seleccione el tercer paso y elimínelo mediante el botón -. Haga clic en OK (Aceptar) (figura 9).

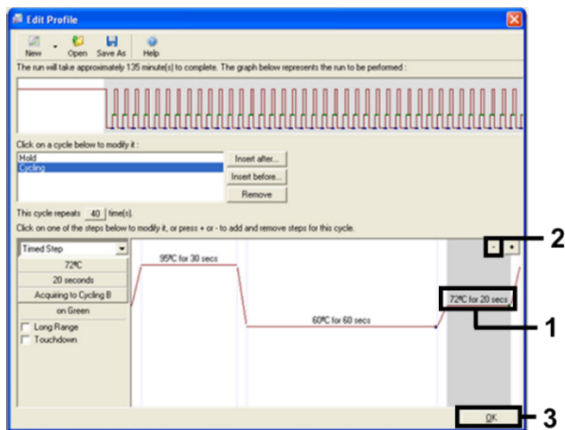


Figura 9. Eliminación del paso de extensión

12. En el cuadro de diálogo siguiente, haga clic en Gain Optimisation (Optimización de ganancia) (Figura 10).

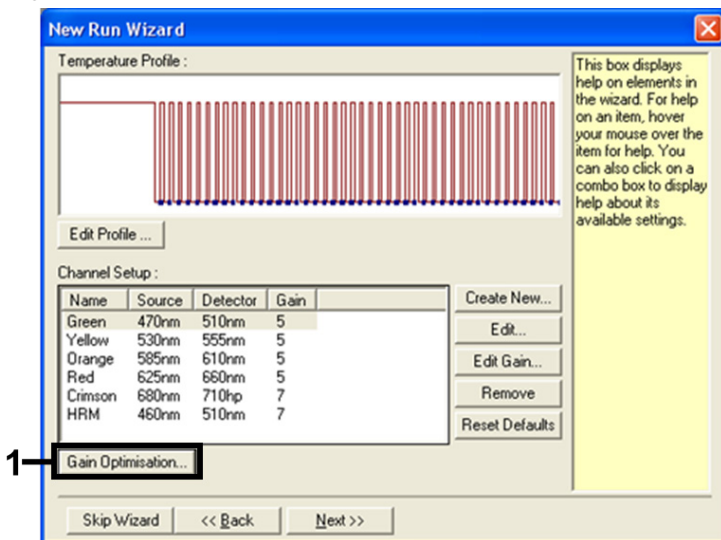


Figura 10. Optimización de la ganancia.

13. Haga clic en Optimise Acquiring (Optimizar adquisición). Para cada canal, se muestra la configuración de canal. Acepte los valores predeterminados para ambos canales haciendo clic en OK (Aceptar). (Figura 11).

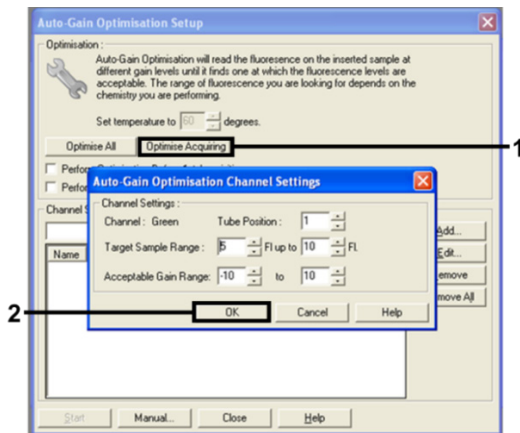


Figura 11. Optimización de la ganancia automática para el canal verde

14. Marque la casilla Perform Optimisation before 1st Acquisition (Ejecutar la optimización antes de la primera adquisición) y, a continuación, haga clic en Close (Cerrar) para volver al asistente (Figura 12).

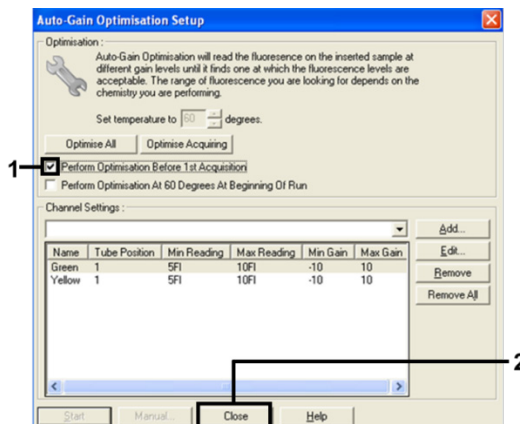


Figura 12. Selección de los canales verde y amarillo

15. Haga clic en Next (Siguiente) para guardar el molde en una ubicación apropiada. Para ello, seleccione «Save Template» (Guardar molde).

Análisis de los datos de valoración de las mutaciones

Una vez completada la serie, debe analizar los datos con el siguiente procedimiento.

Configuración del análisis del software

1. Utilice el software Rotor-Gene Q 2.3.5 o superior para abrir el archivo adecuado.
2. Si no se ha definido el nombre de las muestras antes de realizar la serie, haga clic en Edit Samples (Editar muestras).
3. Introduzca los nombres de las muestras en la columna Name (Nombre).
Nota: Deje en blanco los nombres de los pocillos vacíos.
4. Haga clic en Analysis (Análisis). En la página de análisis, haga clic en Cycling A Yellow para comprobar el canal HEX.
5. Compruebe que la opción Dynamic Tube (Tubo dinámico) está resaltada. Haga clic en Slope Correct (Corrección de pendiente) y Linear scale (Escala lineal).
6. Haga clic en Take Off Adj (Ajuste de inicio) e introduzca los valores 15.01 (15,01) y 20.01 (20,01) tal como se indica en la Figura 13.

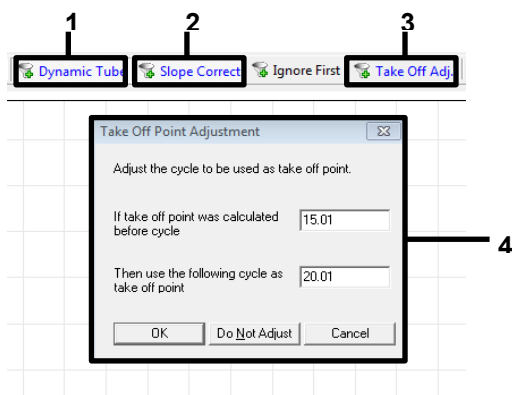


Figura 13. Configuración de normalización del análisis de EGFR. 1 = «Dynamic Tube» (Tubo dinámico), 2 = «Slope Correct» (Corrección de pendiente), 3 = «Take Off Adj» (Ajuste de inicio), 4 = Ventana de diálogo «Take Off Point Adjustment» (Ajuste del punto de inicio) con los valores de los parámetros.

7. Configure el umbral en 0.02 (0,02) y compruebe los valores de C_T de HEX.
8. En la página de análisis, haga clic en Cycling A Green para ver el canal FAM. Configure los parámetros tal como se indica en la figura 13 (arriba).
El tubo dinámico debe aparecer resaltado.
9. Haga clic en Slope Correct (Corrección de pendiente) y Linear scale (Escala lineal).
10. Configure el umbral en 0.075 (0,075) y compruebe los valores de C_T de FAM.

Análisis de control de la serie

Una vez finalizada la serie, debe analizar los datos tal como se indica a continuación.

- **Control negativo:** Para garantizar que el molde no está contaminado, el NTC no debe generar un valor de C_T en el canal verde (FAM) por debajo de 40. Para garantizar que la serie está configurada correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación de 29,85 a 35,84 en el canal amarillo (HEX) (control interno).

La serie no es válida si existe amplificación positiva en el canal verde y/o una amplificación fuera del intervalo de 29,85 a 35,84 en el canal amarillo.

- **Control positivo:** El control positivo (Positive Control, PC) de EGFR debe generar un valor de C_T para cada mezcla de reacción dentro del intervalo que se indica en la tabla 5 (incluidos los valores especificados). Una serie con un valor de control positivo fuera de este intervalo indica un problema de configuración en el ensayo, por lo que la serie debe señalarse como errónea. Si el control positivo genera un valor de C_T dentro del intervalo (FAM), pero el valor de C_T del control interno (HEX) se encuentra fuera del intervalo de 29,85 a 35,84, puede continuar con el análisis.

Nota: No deben utilizarse los datos de las muestras si falla el control negativo o el positivo.

Tabla 5. Intervalo de C_t aceptable para los controles de series

Control de reacción	Ensayo	Canal	Intervalo de C _t
Control positivo	Control	Green (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22-34,98
	Deleciones	Green (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97-34,81
Control sin molde	Las cuatro mezclas de reacción	Green (FAM)	≥40,00
	Las cuatro mezclas de reacción	Yellow (HEX)	29,85-35,84

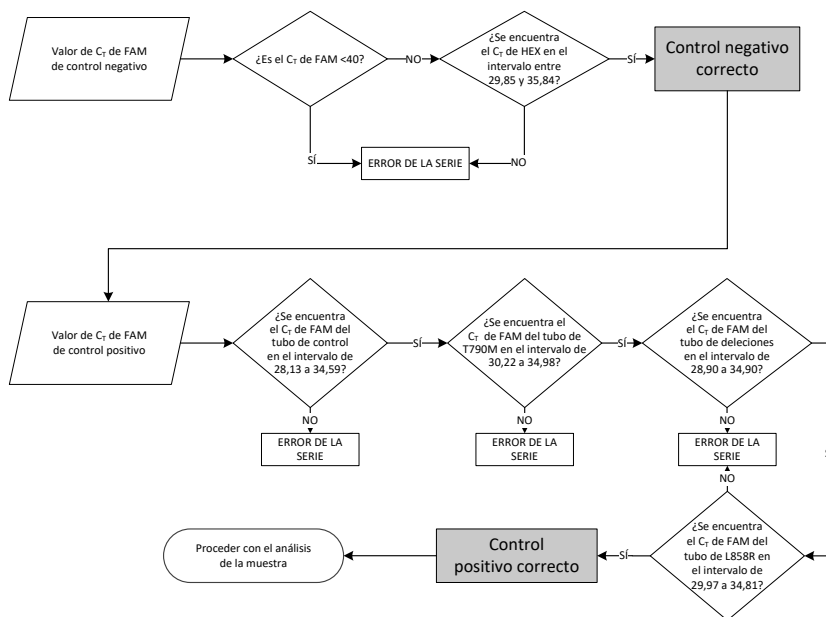


Figura 14. Flujo de trabajo del análisis de control de la serie.

Siempre que ambos controles de series sean válidos, cada valor de C_T del ensayo de control de la muestra debe estar comprendido en el intervalo de 23,70 a 31,10 en el canal verde (FAM) (Tabla 6).

Tabla 6. Intervalo de C_T de FAM aceptable para la reacción de control de la muestra

Mezcla de reacción	Canal	Intervalo de C_T aceptable
Control	Green (FAM)	23,70-31,10

Si la muestra se encuentra fuera de este intervalo, se proporciona la guía siguiente.

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra $<23,70$: las muestras con un valor de C_T de control $<23,70$ sobrecargarán los ensayos de mutación y deben diluirse. Para detectar cada mutación en un nivel bajo, las muestras sobreconcentradas se deben diluir para que se encuentren en el intervalo mencionado anteriormente, partiendo de la base de que diluir a la mitad aumentará el valor de C_T en 1.
- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra $>31,10$: la muestra no contiene una cantidad suficiente de ADN para realizar el análisis.

Siempre que ambos controles de series sean válidos y el ensayo de control esté comprendido en el intervalo indicado en la Tabla 6, cada valor de C_T de la mutación de muestras debe encontrarse dentro del intervalo detallado en la Tabla 7 en el canal verde (FAM). Si la muestra se encuentra fuera de este intervalo, se proporciona la guía siguiente.

Tabla 7. Valores de reacción de mutación de muestras aceptables

Reacción	Mezcla de reacción	Canal	Intervalo de C_T
Reacción de mutación	T790M	Green (FAM)	0,00-40,00
	Deleciones	Green (FAM)	0,00-40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00-40,00
	Las tres mutaciones	Yellow (HEX)	29,85-35,84

Nota: Si una muestra no genera un valor de C_T (es decir, $C_T > 40$), puede deberse a la presencia de un inhibidor, a un error en la configuración del ensayo o a que no hay ADN amplificable de EGFR.

- El valor de C_T del control interno se encuentra dentro del intervalo 29.85–35.84: no hay ADN amplificable de EGFR.
- Valor de C_T del control interno fuera del intervalo 29,85-35,84: podría indicar un error de configuración del ensayo o la presencia de un inhibidor. El efecto del inhibidor se puede reducir diluyendo la muestra, aunque esto también diluirá el ADN.

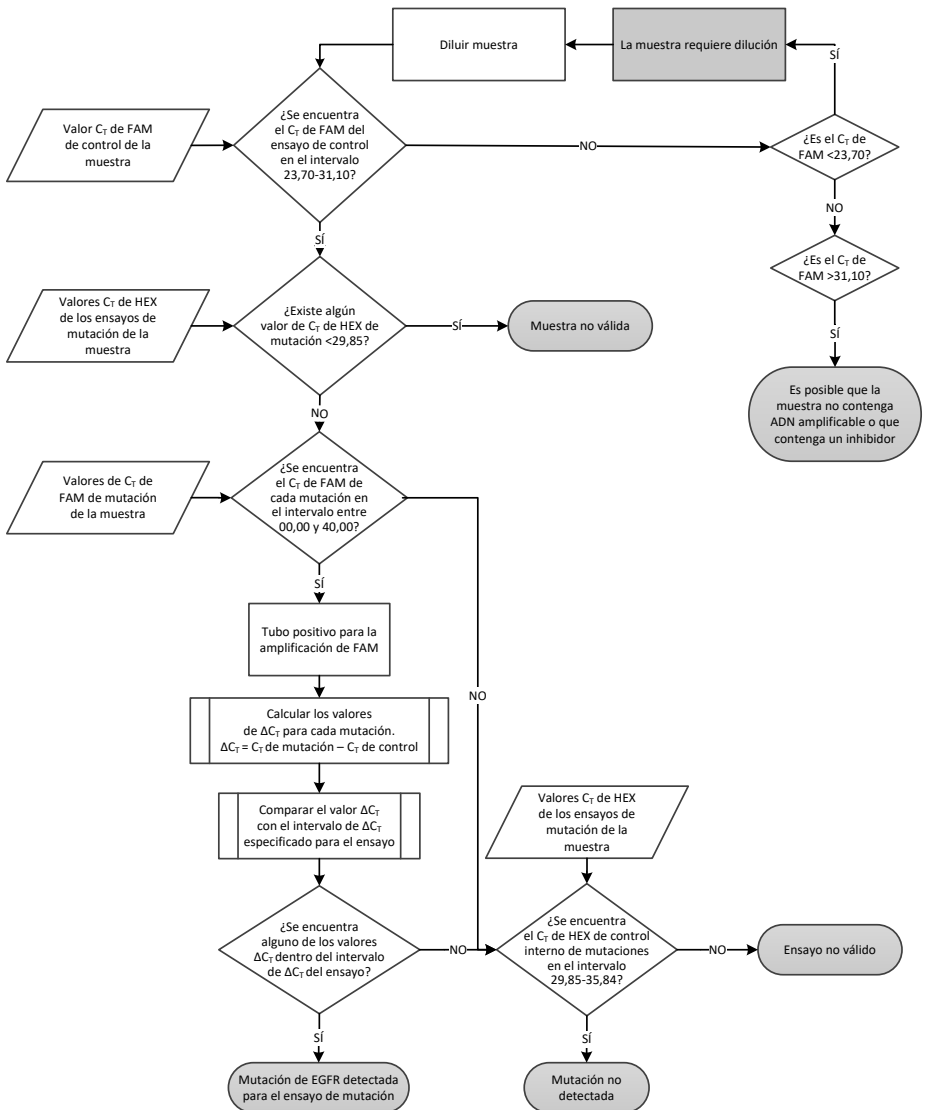


Figura 15. Organigrama del análisis de mutación.

Valor de C_T de FAM de los ensayos de mutaciones de la muestra

Es necesario comparar los valores de FAM de las tres mezclas de reacción de mutación con los valores que se muestran en la tabla 8.

Calcule el valor de corte de ΔC_T para todas las muestras de mutación que presenten amplificación positiva tal y como se indica a continuación. Es importante utilizar los valores de C_T de mutación y de control de la misma muestra.

$$\Delta C_T = C_T \text{ de mutación} - C_T \text{ de control}$$

Compare el valor de ΔC_T de la muestra con el intervalo de corte de ΔC_T del ensayo en cuestión (Tabla 8). Compruebe que se aplique el punto de corte correcto para cada ensayo.

Tabla 8. Intervalo de corte de ΔC_T del ensayo de mutación

Ensayo de mutación	Intervalo de corte de ΔC_T
T790M	De $-10,00 \geq \alpha \leq 7,40$
Deleciones	De $-10,00 \geq \alpha \leq 8,00$
L858R	De $-10,00 \geq \alpha \leq 8,90$

El límite superior del intervalo de corte de ΔC_T es el punto a partir del que una señal positiva podría ser la respuesta a una señal de fondo del cebador de ARMS en ADN nativo. Si el valor de ΔC_T de la muestra es superior al punto superior del intervalo de corte de ΔC_T , se clasifica como «Mutation not detected» (Mutación no detectada) o fuera de los límites de detección del kit. Si el valor de la muestra está dentro de los puntos de corte de ΔC_T , la muestra se considera positiva para la mutación detectada por ese ensayo. Si el valor de la muestra está por debajo del límite inferior del intervalo de corte de ΔC_T , esto podría ser la respuesta a un artefacto de fluorescencia.

Nota: Para las muestras que no presentan un valor de C_T de mutación de FAM, es necesario realizar una evaluación del valor de C_T de control interno (HEX) para determinar si la mutación no se detecta o si el ensayo no es válido. Si el valor de C_T de HEX se encuentra entre 29,85 y 35,84, la mutación no se detecta. Si el valor de corte de ΔC_T de HEX se encuentra fuera de este intervalo, la muestra no es válida.

En resumen, para cada muestra, las reacciones de mutación recibirán un estado de mutación detectada, mutación no detectada o no válido según los siguientes criterios.

- **Mutación detectada:** La amplificación positiva de FAM y el valor de ΔC_T están dentro del intervalo de corte de ΔC_T . Si se detectan varias mutaciones, pueden notificarse todas.
- **Mutación no detectada:**
 - La amplificación de FAM es positiva y el valor de corte de ΔC_T está por encima del intervalo de corte de ΔC_T y HEX (control interno) se encuentra dentro del intervalo 29,85-35,84.
 - La amplificación de FAM es negativa y HEX (control interno) se encuentra dentro del intervalo 29,85-35,84.
- **No válido:** la amplificación de FAM es negativa y la amplificación de HEX se encuentra fuera de las especificaciones.
 - El valor de ΔC_T calculado está por debajo del intervalo de corte de ΔC_T y HEX (control interno) se encuentra dentro del intervalo previsto. Un valor de ΔC_T inferior a $-10,00$ indica que puede haber ocurrido un artefacto de fluorescencia.

Guía para la resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de preguntas frecuentes de nuestro Centro de servicio técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN siempre se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Sin señal para el control positivo (Positive Control, PC) de EGFR en el canal de fluorescencia Cycling Green

- | | |
|--|--|
| a) El canal de fluorescencia seleccionado para el análisis de los datos de PCR no cumple el protocolo. | Para el análisis de datos, debe seleccionar el canal de fluorescencia Cycling Green para la PCR de EGFR analítica y el canal de fluorescencia Cycling Yellow para la PCR de control interno. |
| b) La programación del perfil de temperatura del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM no es correcta | Compare el perfil de temperatura con el protocolo y, si no es correcto, repita la serie. |
| c) La configuración de la PCR no es correcta | Compruebe los pasos de trabajo por medio del esquema de pipeteo y repita la PCR en caso necesario. |
| d) Las condiciones de conservación de uno o más componentes del kit no cumplan las instrucciones indicadas en el apartado «Almacenamiento y manipulación de reactivos» en la página 14 | Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (en la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario. |
| e) El <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit ha caducado | Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (en la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario. |

Comentarios y sugerencias

Señales con los controles negativos en el canal de fluorescencia y Cycling Green de la PCR analítica

- a) Se ha producido contaminación durante la preparación de la PCR
- Repita la PCR con reactivos nuevos en duplicados.
Si fuera posible, cierre los tubos de PCR justo después de añadir la muestra que va a analizarse.
Asegúrese de descontaminar el espacio y los instrumentos de trabajo periódicamente.
-

Cruce de varios umbrales o valor de ΔC_T por debajo del intervalo de corte

- a) Mezclado incorrecto durante la configuración del ensayo
- Repita la PCR si esto afecta a un control o vuelva a analizar la muestra fallida.
Siga las instrucciones de uso y preste especial atención a los pasos de mezclado.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit se analiza en cuanto a las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

Limitaciones

Los resultados del producto deben interpretarse dentro del contexto de todos los hallazgos clínicos o de laboratorio relevantes y no deben utilizarse independientemente para diagnóstico.

Solo el personal especialmente formado y cualificado en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* y el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM puede utilizar el producto.

Los estudios de validación analítica han utilizado ADN humano extraído de muestras de plasma.

El producto es para uso exclusivo en el termociclador para real-time PCR de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Para obtener unos resultados óptimos, es preciso que siga detenidamente las instrucciones indicadas en el manual de uso del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. No se recomienda la dilución de reactivos distintos a los descritos en este manual. De lo contrario, el rendimiento se verá disminuido.

Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad y las condiciones de almacenamiento impresas en las cajas y etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados o mal almacenados.

Los primers de la mezcla de reacción de deleciones de EGFR se han designado para dirigirse a varias deleciones del exón 19, que abarcan los nucleótidos del 55174772 al 55174795 (GRCh38 chr7), un intervalo de 23 pb.

Aunque el ensayo de deleciones del exón 19 se ha validado analíticamente y se ha mostrado que detecta deleciones específicas dentro del exón 19 (consulte la tabla 13 de este manual), es posible no obstante amplificar mediante la mezcla de reacción de deleciones las mutaciones adicionales (incluidas, entre otras, las deleciones del exón 19, las inserciones del exón 19 y la mutación L747P).

Si están presentes, estas mutaciones adicionales darán lugar a un resultado «Deletions Detected» (Deleciones detectadas) para una muestra de paciente determinada.

Además, es posible detectar la mutación L858Q mediante la mezcla de reacción L858R. Por tanto, si está presente en una muestra de paciente, la mutación L858Q puede dar lugar a un resultado «L858R Mutation Detected» (Mutación L858R detectada).

Características del rendimiento

Sensibilidad analítica: límite de blanco (Limit of Blank, LOB)

Para valorar el rendimiento del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit en ausencia de molde y para garantizar que una muestra blanco o una muestra con ADN nativo no genere una señal analítica que pueda indicar una concentración baja de la mutación, se evaluó el ADN nativo de EGFR obtenido de plasma NSCLC de 59 muestras diferentes. Se cumplió el criterio de aceptación del estudio (como mínimo el 95 % de las muestras nativas debe presentar un valor de corte de ΔC_T por encima del valor de corte respectivo).

Límite de detección (Limit of Detection, LOD)

El valor del LOD es el porcentaje mínimo de ADN mutante que se puede detectar en un fondo de ADN nativo cuando el ADN amplificable total (dentro del intervalo de introducción) identifica mutaciones correctamente al 95 % para cada muestra positiva para mutación (C95). El intervalo de funcionamiento de la introducción del ADN establecido para el ensayo viene definido por el intervalo especificado previamente para el valor de C_T comprendido entre 23,70 y 31,10.

El LOD se determinó con niveles bajos de ADN introducido (valor de C_T de control de aproximadamente 30.10) a partir de ADN derivado de muestras de tejido fijadas en formalina e impregnadas en parafina (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) para el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. El LOD se determinó mediante materiales de muestra clínicos de FFPE y líneas celulares FFPE con niveles bajos de ADN introducido para estas mutaciones de EGFR.

Se verificaron los valores del LoD establecidos mediante tejido FFPE para el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit con ADN obtenido de muestras artificiales de plasma positivas para la mutación.

En la tabla 9 que aparece en la siguiente página, se presentan los valores del LOD finales, que indican el porcentaje de mutación con el que se obtiene una probabilidad predicha de identificaciones correctas del 95 % para cada una de las mutaciones.

Tabla 9. LOD de cada uno de los ensayos de mutación de EGFR

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

*Valores de LOD verificados en plasma como parte del estudio de confirmación del LOD del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

†Estas mutaciones no se confirmaron en plasma.

Sensibilidad analítica: valores de corte de ΔC_T e intervalo de corte de ΔC_T

Se aplicó un enfoque basado en los riesgos respecto a las tasas de falsos positivos cuando se establecieron los valores de corte del ensayo, y se utilizaron estimaciones de los valores del LOB como componente para desarrollar los valores de corte.

Los respectivos intervalos de corte de ΔC_T establecidos para cada ensayo de mutación del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Intervalos de corte de ΔC_T del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Ensayo de mutación	Δ Intervalo de corte de C_T
T790M	De $-10,00 \geq \alpha \leq 7,40$
Deleción	De $-10,00 \geq \alpha \leq 8,00$
L858R	De $-10,00 \geq \alpha \leq 8,90$

Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad y la reproducibilidad se evaluaron mediante el análisis del nivel de mutación con 3 x LOD en un entorno de ADN genómico nativo en 3 centros de análisis, utilizando varios lotes de kits, usuarios y series durante distintos días, con dos duplicados de cada muestra. En los 3 ensayos de mutación, el 100 % de las muestras de ADN mutante obtuvieron resultados positivos para la mutación. Las muestras nativas obtuvieron resultados negativos para la mutación en todos los ensayos de todos los centros.

Efecto del ADN introducido sobre los valores de C_T

El nivel de ADN introducido se define como la cantidad total de ADN de EGFR amplificable de una muestra a partir de los valores de C_T obtenidos de la reacción de control. Para mostrar que el rendimiento del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit se mantiene coherente en todo el intervalo de valores de C_T de la reacción de control (23.70–31.10), se analizaron los 3 ensayos de mutación de EGFR con una serie de diluciones 1:3 de seis puntos (ADN extraído de líneas celulares de FFPE). El valor de C_T diana para la dilución 1, para cada mutación, fue de 24,70 aproximadamente. La dilución final, con un valor de C_T de aproximadamente 32-33, estaba fuera del intervalo de C_T para la reacción de control. En resumen, los valores de corte de ΔC_T medidos en los diferentes niveles de ADN introducido total se mantuvieron coherentes en todo el intervalo de funcionamiento del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Sustancias interferentes

Sustancias interferentes endógenas

Las posibles sustancias interferentes se añadieron a las muestras artificiales de plasma positivas para la mutación 3 x LOD. A continuación, las muestras se analizaron con el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Las muestras que contenían posibles sustancias interferentes se compararon con las muestras artificiales de plasma positivas para la mutación 3 x LOD que no contenían ninguna sustancia interferente añadida. Cada sustancia interferente se analizó con 4 duplicados.

Se consideró que una diferencia de >2x desviaciones estándar (Standard Deviation, SD) (tomada del estudio de la precisión) entre los valores de ΔC_T del «análisis» y el «control» (es decir, sin sustancia interferente) indicaba una posible interferencia. En estos casos, se proporciona la diferencia observada entre los valores de ΔC_T .

Las concentraciones de pruebas que se muestran en la tabla 11 se seleccionaron a partir de los requerimientos EP07-A2 del CLSI y representan las concentraciones máximas esperadas en una muestra clínica.

Nota: Estos compuestos endógenos se añadieron a muestras artificiales de plasma positivas para la mutación que contenían plasma de donantes sanos. Por lo tanto, los compuestos endógenos habrían estado presentes de forma natural en las muestras en concentraciones desconocidas antes de realizar la adición. La concentración final de cada una de las posibles sustancias interferentes endógenas analizadas posiblemente sea mayor que la concentración de la prueba.

Tabla 11. Posibles sustancias endógenas interferentes

Posibles sustancias interferentes (Interfering Substances, SI)	Concentración de la prueba
Bilirrubina no conjugada	15 mg/dl
Hemoglobina (humana)	0,2 g/dl
Triglicéridos	3 g/dl

Ensayo T790M

Los siguientes compuestos endógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 11 resultaron tener un efecto $>2 \times SD$ (ΔC_T de 0,40) en el rendimiento del ensayo T790M:

- Triglicéridos, diferencia de ΔC_T de 1,37

Ensayo de deleciones

Los siguientes compuestos endógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 11 resultaron tener un efecto $>2 \times SD$ (ΔC_T de 0,71) en el rendimiento del ensayo de deleciones:

- Hemoglobina, diferencia de ΔC_T de 0,80

Ensayo L858R

Los siguientes compuestos endógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 11 resultaron tener un efecto $>2 \times SD$ (ΔC_T de 0,56) en el rendimiento del ensayo L858R:

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

Sustancias interferentes exógenas

Las posibles sustancias interferentes se añadieron a las muestras artificiales de plasma positivas para la mutación $3 \times LOD$. A continuación, las muestras se analizaron con el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Las muestras que contenían posibles sustancias interferentes se compararon con las muestras artificiales de plasma positivas para la mutación $3 \times LOD$ que no contenían ninguna sustancia interferente añadida. Cada sustancia interferente se analizó con 4 duplicados.

Se consideró que una diferencia de $>2x$ desviaciones estándar (tomada del estudio de la precisión) entre los valores de ΔC_T del «análisis» y el «control» (es decir, sin sustancia interferente) indicaba una posible interferencia. En estos casos, se proporciona la diferencia observada entre los valores de ΔC_T .

Las concentraciones de pruebas que se muestran en la tabla 12 se seleccionaron a partir de los requerimientos EP07-A2 del CLSI y exceden la concentración terapéutica en todos los casos.

Tabla 12. Posibles sustancias endógenas interferentes

Possible sustancia interferente (Interfering Substance, SI)	Concentración de la prueba ($\mu\text{g/ml}$)
Hidrobromuro de citalopram	0,75
Hemihidrato de hidrocloreuro de paroxetina	1,14
Hidrocloreuro de sertralina	0,67
Hidrocloreuro de fluoxetina	3,87
Acetaminofeno	200,7
EDTA K ₂	3600

Ensayo T790M

Los siguientes compuestos exógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 12 resultaron tener un efecto $>2 \times SD$ (ΔC_T de 0,40) en el rendimiento del ensayo T790M:

- Hidrobromuro de citalopram, diferencia de ΔC_T de 0,52
- Hidrocloruro de sertralina, diferencia de ΔC_T de 0,47
- Hidrocloruro de fluoxetina, diferencia de ΔC_T de 0,48

Ensayo de deleciones

Los siguientes compuestos exógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 12 resultaron tener un efecto $>2 \times SD$ (ΔC_T de 0,71) en el rendimiento del ensayo de deleciones:

- Fluoxetina, diferencia de ΔC_T de 0,73

Ensayo L858R

Los siguientes compuestos exógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 12 resultaron tener un efecto $>2 \times SD$ (ΔC_T de 0,56) en el rendimiento del ensayo L858R:

- Hidrobromuro de citalopram, diferencia de ΔC_T de 0,72
- Hemihidrato de hidrocloruro de paroxetina, diferencia de ΔC_T de 0,92
- Hidrocloruro de sertralina, diferencia de ΔC_T de 0,82
- Hidrocloruro de fluoxetina, diferencia de ΔC_T de 0,98
- Acetaminofeno, diferencia de ΔC_T de 0,81
- EDTA K₂, diferencia de ΔC_T de 0,57

Rendimiento clínico

El ensayo clínico NCT01203917 era un estudio abierto de fase IV y de grupo único para evaluar la eficacia y la seguridad/tolerabilidad del gefitinib como tratamiento primario en pacientes caucásicos en fase IIIA/B/IV positivos para la mutación de EGFR con NSCLC.

Se determinó la idoneidad de los pacientes para someterse al ensayo clínico NCT01203917 mediante la presencia de mutaciones sensibilizadas de EGFR. Se evaluó el estado de la mutación de EGFR de los pacientes con NSCLC a partir de un ensayo de pruebas clínicas (Clinical Trial Assay, CTA) con ADN proveniente de muestras de plasma y tejido emparejadas. El estudio incluía un objetivo exploratorio de biomarcador previamente planeado para establecer si se podrían utilizar muestras de plasma para realizar el análisis de mutación en caso de que no existan muestras de tejido disponibles. Los resultados mostraron altas tasas de concordancia entre las muestras de plasma y tejido emparejadas, un 94,3 %, con una especificidad del ensayo del 99,8 % y una sensibilidad del 65,7 %.

Se llevaron a cabo pruebas retrospectivas de materiales de muestra de plasma obtenidas de pacientes sometidos al cribado del ensayo clínico NCT01203917 con el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Se realizó un estudio puente para evaluar la concordancia del *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit con el CTA utilizado en la selección de los pacientes del ensayo clínico NCT01203917. Esto permitió mostrar la equivalencia entre el CTA y el *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Referencias













1. Douillard, J.Y., et al. (2014). First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 110(1), 55.
2. Walsh, K., et. al. (2014) A cautionary lesson on the use of targeted methods for EGFR mutation analysis; a case report. *J. Clin. Pathol.* 67, 734
3. Huang, J., Wang, Y., Zhai, Y., and Wang, J. (2018) Non-small cell lung cancer harboring a rare EGFR L747P mutation showing intrinsic resistance to both gefinitib and osimertinib (AZD9291): A case report. *Thorac. Cancer.* 9, 745

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visite nuestro Centro de servicio técnico en el sitio www.qiagen.com/Support, llame al 00800-22-44-6000 o póngase en contacto con uno de los departamentos del servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Símbolos

En las instrucciones de uso o en el embalaje y en el etiquetado pueden aparecer los siguientes símbolos:

Símbolo	Definición del símbolo
 Σ <N>	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material (p. ej., el etiquetado de los componentes)
	Componentes
	Contiene
	Número
	Número mundial de artículo comercial
Rn	“R” es la revisión de las Instrucciones de uso y “n” es el número de revisión
	Limitación de temperatura
	Fabricante

Símbolo

Definición del símbolo



Consultar las instrucciones de uso



Advertencia/precaución

Apéndice A: detalles de mutación

La tabla 13 muestra los ID COSMIC del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabla 13. Lista de mutaciones e identificadores COSMIC

Mutación	Exón	Cambio de base	ID COSMIC
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
		2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (complejo)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (complejo)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (complejo)	12422
Deleciones	19	2238_2252>GCA (complejo)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (complejo)	12382
		2239_2258>CA (complejo)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (complejo)	12383

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit: para la detección de mutaciones en el gen EGFR		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: 1 ensayo de control, 7 ensayos de mutaciones, control positivo, enzima ADN polimerasa <i>Taq</i>	870311
Equipo Rotor-Gene Q MDx y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para real-time PCR y analizador de High Resolution Melt (disociación de alta resolución, HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para real-time PCR y analizador de High Resolution Melt (disociación de alta resolución) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002032

Producto	Contenido	N.º de cat.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para la configuración de reacción manual con pipeta de un solo canal en tubos de 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapones para 1000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapones para 10.000 reacciones	981106
Productos relacionados		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Para 50 preparaciones: columnas QIAamp Mini, extensores de tubos (20 ml), QIAGEN Proteinase K, ARN transportador, tampones, VacConnectors y Collection Tubes (1.5 ml y 2 ml)	55114

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual del usuario o el manual de uso del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales de uso y los manuales del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Historial de revisiones del documento

Revisión	Descripción
R4, octubre 2019	<p>Se ha cambiado el fabricante legal (página de portada)</p> <p>Se ha cambiado el nombre del equipo de Rotor-Gene Q MDx a Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, para adaptarse al nombre de la etiqueta del equipo</p> <p>Se han cambiado las instrucciones de almacenamiento de reactivos de 90 días a 12 meses o hasta la fecha de caducidad</p> <p>Se ha actualizado la sección Limitaciones con información sobre el ensayo de deleciones del exón 19 y el ensayo L858R.</p> <p>Se ha modificado la Tabla 9 para sustituir L858R de exón 21 duplicado por deleciones del exón 19.</p> <p>Se ha eliminado el símbolo de EC + REP de la página de portada y de la sección Símbolos</p>
R5, junio de 2020	<p>Se han actualizado las referencias al software RGQ, de la versión 2.3 a la 2.3.5 o posterior</p> <p>Se han actualizado las Tablas 8 y 10 para implementar el nuevo intervalo de corte de ΔC_T y se han modificado todas las descripciones pertinentes en consecuencia en todo el manual de uso</p> <p>Se han actualizado todos los capítulos del Protocolo para incluir información sobre la importancia del mezclado en las secciones de Cuestiones importantes antes de comenzar; se han resaltado los detalles de mezclado en todos los pasos de mezclado</p> <p>Se ha añadido un paso de mezclado a la sección «Protocolo: detección de mutaciones de EGFR»</p> <p>Se ha actualizado la sección Resolución de problemas para añadir una solución para el cruce de varios umbrales.</p>
R6, junio de 2022	<p>Se ha actualizado la tabla en el apartado Sustancias interferentes para revisar la concentración de prueba para bilirrubina no conjugada de 150 a 15 mg/dbl</p>

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

Acuerdo de licencia limitada para el *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el producto y a este manual de uso y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el panel. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este panel ni su(s) uso(s) no infrinjan derechos de terceros.
3. Este panel y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del panel aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para consultar los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], *therascreen*[®], Rotor-Gene[®], Scorpions[®] (QIAGEN Group); FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA[®] (AstraZeneca Group). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley.

Junio -2022 HB-1898-007 1127512ES © 2022 QIAGEN, reservados todos los derechos.

