

Octubre 2019

Manual de uso del *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit



Versión 2

IVD

Para uso diagnóstico in vitro

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

CE

REF

874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, ALEMANIA

R6 **MAT**

1119191ES

Contenido

Uso previsto	5
Resumen y explicación	6
Principio del procedimiento	9
Materiales suministrados	13
Contenido del kit.....	13
Materiales requeridos pero no suministrados.....	14
Advertencias y precauciones	17
Precauciones generales	17
Almacenamiento y manipulación de reactivos	20
Condiciones de envío	20
Condiciones de almacenamiento	20
Manipulación y almacenamiento del material de muestra	22
Procedimiento	23
Extracción y preparación del ADN.....	23
Protocolo: Valoración de las muestras	24
Protocolo: detección de mutaciones de EGFR	39
Interpretación de los resultados (automática)	53
Indicadores del software <i>therascreen</i> EGFR Assay Package para Rotor-Gene Q	55
Guía de resolución de problemas.....	59
Control de calidad	60
Limitaciones	60

Características de rendimiento	62
Rendimiento analítico	62
Límite de blanco (Limit of Blank, LOB), intervalo de funcionamiento y valores de corte...	62
Efecto del ADN introducido sobre los valores de ΔC_T	63
Reactividad cruzada.....	64
Exactitud: comparación con el método de referencia analítico	64
Valores del límite de detección (Limit of Detection, LOD)	65
Interferencia	67
Reproducibilidad.....	68
Rendimiento clínico	72
Datos de resultados clínicos: GIOTRIF®	72
Datos de resultados clínicos: IRESSA®	74
Referencias	77
Símbolos	79
Apéndice A: Protocolo manual del <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit.....	80
Información general.....	80
Protocolo: creación de un perfil de temperatura	80
Procedimiento (manual).....	92
Protocolo: valoración de las muestras (manual)	92
Protocolo: detección de mutaciones de EGFR (manual)	92
Protocolo: configuración del <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit con el software Rotor-Gene Q	93
Interpretación de los resultados (manual)	99
Configuración del análisis del software	99

Análisis de los datos de valoración de las muestras	101
Análisis de los datos de la detección de mutaciones del gen EGFR.....	102
Apéndice B: instalación del software <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package	110
Información de contacto.....	113
Información para pedidos.....	114
Historial de revisiones del documento	116

Uso previsto

El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit es una prueba de diagnóstico in vitro diseñada para la detección de 29 mutaciones somáticas en el gen EGFR. Proporciona una valoración cualitativa del estado de mutación en muestras tumorales obtenidas de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Los resultados tienen como objetivo ayudar al personal médico a identificar pacientes con NSCLC que puedan beneficiarse de un tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa del EGFR.

El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit analiza muestras de ADN extraídas de tejido tumoral fijado en formalina e impregnado en parafina (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE) de pacientes con NSCLC y se ejecuta en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Está concebido para el uso por parte de personal cualificado en entornos profesionales de laboratorio.

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

Resumen y explicación

En los cánceres humanos (1, 2), el oncogén EGFR presenta mutaciones. La existencia de estas mutaciones se relaciona con la respuesta a determinadas terapias de inhibidores de la tirosina quinasa (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) en pacientes con NSCLC (3-8). Este tipo de mutaciones en el oncogén EGFR están presentes en la población general de pacientes con NSCLC con una frecuencia aproximada del 10 % en pacientes de EE. UU., Europa o Australia y de hasta el 30 % en pacientes de Japón y Taiwán (1, 2, 9).

El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit es un kit listo para utilizar que se ha diseñado para la detección de 29 mutaciones del gen EGFR relacionado con el cáncer mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) en un equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Gracias a las tecnologías Scorpions® (10) y ARMS (sistema de mutación refractario a la amplificación o Amplification Refractory Mutation System, ARMS) (11), el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit permite detectar 29 mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del oncogén EGFR frente a un fondo de ADN genómico nativo (tabla 1). En resumen:

- 19 deleciones del exón 19 (detecta la presencia de cualquiera de las 19 deleciones, pero no distingue entre ellas)
- Tres inserciones en el exón 20 (detecta la presencia de cualquiera de las tres inserciones, pero no distingue entre ellas)
- G719X (detecta la presencia de G719S, G719A o G719C, pero no distingue entre ellas)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

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 ADN mutante en un fondo de ADN genómico nativo. Los límites de selectividad y detección son superiores a los de otras tecnologías como la de secuenciación por terminador fluorescente.

Tabla 1. Lista de mutaciones e identificadores COSMIC

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Deleciones	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 mutaciones somáticas en casos de cáncer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Continuación de la tabla en la página siguiente

Continuación de la tabla de la página anterior

Tabla 1 Lista de mutaciones e identificadores COSMIC

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base
20	S768I	6241	2303G>T
	Inserciones	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 mutaciones somáticas en casos de cáncer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

** Las mutaciones COSM6254 (2239_2253del15) y COSM12369(2240_2254del15) dan lugar a la delección de 15 pares de bases de la secuencia de EGFR. La misma secuencia final se genera mediante ambas mutaciones, y estas mutaciones son indistinguibles entre ellas. Por tanto, la mutación COSM6254 (2239_2253del15) se ha eliminado de la versión más reciente de COSMIC (v83) y ambas mutaciones se representan ahora mediante COSM12369 (2240_2254del15). Esto sigue la directriz de la HGVS para representar la delección más cercana al extremo 3'. La prueba theascreen para EGFR no distingue entre las mutaciones de delección del exón 19, y las delecciones positivas se denominan "Deletions" (Delecciones). Este cambio afecta solo a la documentación y no afecta al kit ni a su capacidad de detectar ninguna mutación individual.

Principio del procedimiento

El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit incluye ocho mezclas de reacción distintas de amplificación mediante PCR: siete reacciones específicas para mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del oncogén EGFR y un control nativo para el exón 2. Los componentes principales del kit se explican a continuación.

ARMS

La tecnología ARMS permite llevar a cabo una amplificación específica de los alelos o las mutaciones. La enzima ADN polimerasa *Taq* (*Taq*) resulta eficaz para diferenciar entre una coincidencia y una falta 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. Scorpions es una técnica de moléculas bifuncionales que contienen un primer de PCR unido covalentemente a una sonda. El fluoróforo de la sonda interactúa con un quencher o supresor, también incorporado en la sonda, lo que reduce la fluorescencia. Durante la PCR, cuando la sonda se une al amplicón, el fluoróforo y el supresor se separan y se produce un aumento detectable de la fluorescencia.

Formato del kit

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

- Un ensayo de control (CTRL)
- Siete ensayos de mutación

Todas las mezclas de reacción contienen reactivos para la detección de dianas marcados con carboxifluoresceína (FAM™), además de un ensayo de control interno marcado con hexaclorofluoresceína (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

El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit incluye un procedimiento de dos pasos. En el primer paso, el ensayo de control se realiza para evaluar el ADN total amplificable de EGFR de una muestra. En el segundo paso, tanto la mutación como los ensayos de control se realizan para determinar la presencia o ausencia de ADN mutante.

Ensayo de control

El ensayo de control, marcado con FAM, sirve para valorar el ADN total amplificable de EGFR de la muestra. El ensayo de control amplifica una región del exón 2 del gen EGFR. Los primers y la sonda Scorpions 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

Nota: Todas las series experimentales deben utilizar controles positivos y negativos.

Control positivo

Cada serie debe contener un control positivo en los tubos del 1 al 8. El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit contiene control positivo (Positive Control, PC) de EGFR que sirve 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 ("no template control", control sin molde o NTC) en los tubos del 9 al 16. El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit contiene agua para el NTC, que se utiliza como "molde" en 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 (Internal Control, IC), además de la reacción diana. Un error indica que pueden existir inhibidores que podrían derivar en un resultado inexacto o bien que se ha producido un error de configuración del usuario para ese tubo. El IC utiliza una secuencia diana para oligonucleótidos anti-EGFR, un primer sin marcar y un primer Scorpions marcado con HEX para diferenciarlo de los Scorpions marcados con FAM en las mezclas de reacción de control y mutación. La amplificación de FAM puede dejar fuera de competencia a la amplificación del IC, por lo que el valor de C_T (HEX) de IC generado podría estar fuera del intervalo especificado. Los resultados de FAM siguen siendo válidos para estas muestras.

Valoración de las muestras

Recomendamos encarecidamente utilizar la mezcla de reacción para control (tubo para CTRL) suministrada con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit a fin de valorar el ADN total amplificable de EGFR de la muestra. El ensayo de control amplifica una región del exón 2 del gen EGFR. Recomendamos preparar las muestras únicamente con el ensayo de control usando el control positivo (Positive Control, PC) de EGFR como control positivo y agua para el “molde” como control sin molde.

Nota: la valoración del ADN debería basarse en la PCR y puede diferir de la cuantificación basada en las lecturas de absorbancia. Se suministra mezcla de reacción para control (tubo para CTRL) adicional para valorar la calidad y la cantidad de las muestras de ADN antes del análisis con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Plataforma y programa

El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit se ha diseñado específicamente para su uso con equipos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. El equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM está programado para distintos parámetros de ciclo, o “series analíticas”, con el software *therascreen* EGFR CE Assay Package.

El software *therascreen* EGFR CE Assay Package consta de dos moldes: “*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template” (para la valoración de las muestras) y “*therascreen* EGFR CE Locked Template” (para la detección de mutaciones de EGFR). Dichos moldes contienen los parámetros de análisis de la PCR y se encargan de calcular los resultados.

También se puede utilizar el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit con el software Rotor-Gene Q versión 2.3 en modo abierto (es decir, sin utilizar el software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Para obtener más información, consulte Apéndice A: *Protocolo* manual del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Materiales suministrados

Contenido del kit

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit				(24)
N.º de catálogo				874111
Número de reacciones				24
Color	Identidad	ID de tubo		Volumen
Rojo	Control Reaction Mix (mezcla de reacción para control)	1	CTRL	2 x 600 µl
Morado	T790M Reaction Mix (mezcla de reacción para T790M)	2	T790M	600 µl
Naranja	Deletions Reaction Mix (mezcla de reacción para deleciones)	3	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (mezcla de reacción para L858R)	4	L858R	600 µl
Verde	L861Q Reaction Mix (mezcla de reacción para L861Q)	5	L861Q	600 µl
Amarillo	G719X Reaction Mix (mezcla de reacción para G719X)	6	G719X	600 µl
Gris	S768I Reaction Mix (mezcla de reacción para S768I)	7	S768I	600 µl
Azul	Insertions Reaction Mix (mezcla de reacción para inserciones)	8	Ins	600 µl
Beis	EGFR Positive Control (control positivo de EGFR)	9	PC	300 µl
Menta	Taq DNA Polymerase (ADN polimerasa Taq)	Taq	2 x 80 µl	2 x 80 µl
Blanco	Nuclease-free water for No Template Control (agua exenta de nucleasas para control sin molde)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Blanco	Nuclease-free water for Dilution (agua exenta de nucleasas para la dilución)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
Manual de uso del <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit				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 correspondientes sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

Reactivos

- Kit para extracción de ADN (consulte Extracción y preparación del ADN)

Fungibles y equipo de laboratorio general

- 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 molde
- Puntas de pipeta exentas de desoxirribonucleasa, ribonucleasa y ADN con filtros (para evitar la contaminación cruzada, se recomiendan puntas de pipeta con filtros para aerosoles)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, para uso con un 72-well rotor (n.º de cat. 981103 o 981106)
- Tubos de microcentrifugadora exentos de desoxirribonucleasa, ribonucleasa y ADN para la preparación de 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 (n.º de cat. 9018901)
- Thermomixer*, incubador orbital térmico*, bloque térmico* o baño de agua* que permita la incubación a 90 °C
- Centrifugadora de mesa* con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Agitadora vorticial*

Equipo para la PCR

- Equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM con canales de fluorescencia para Cycling Green y Cycling Yellow (detección de FAM y HEX, respectivamente) † ‡
- Versión del software Rotor-Gene Q 2.3
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package CD, versión 3.0.5 (n.º de cat. 9023537)

Nota: el software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package requiere el software Rotor-Gene Q versión 2.3.

* Asegúrese de que se hayan revisado y calibrado los equipos según las recomendaciones del fabricante.

† Asegúrese de que se hayan revisado y calibrado los equipos 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 "mmaannn", 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

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 fichas de datos de 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 hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

Para obtener información de seguridad relativa al equipo Rotor-Gene Q, consulte el manual del usuario que se entrega con el equipo.

Elimine los desechos de las muestras y del ensayo de conformidad con la normativa local en materia de seguridad.

Precauciones generales

Debe procederse siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones.

- La prueba se ha diseñado para su uso con materiales de muestra FFPE de NSCLC.
- Almacene y extraiga el material positivo (materiales de muestra y controles positivos) por separado del resto de reactivos y añádale a la mezcla de reacción en una zona separada físicamente.
- 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 separada de la zona donde se añade el molde. Los tubos de Rotor-Gene Q no se deben abrir después de haber finalizado la serie PCR. Con ello, se evita la contaminación del laboratorio con productos posteriores a la PCR.
- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. Los materiales de muestra son material potencialmente infeccioso y deben tratarse como material biopeligroso.
- Los reactivos del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit presentan una dilución óptima. No debe realizarse una mayor dilución de los reactivos, puesto que pueden perder eficacia. No utilice volúmenes de reacción (mezcla de reacción más muestra) inferiores a 25 µl puesto que su uso aumenta el riesgo de falsos negativos.
- Todos los reactivos suministrados en el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. No sustituya los reactivos del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ni los mezcle con los de otros kits *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, ya que esto puede afectar al rendimiento.
- Utilice únicamente la ADN polimerasa *Taq* (tubo para *Taq*) suministrada con el *therascreen* EGFR RGQ PCR 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.
- No utilice componentes caducados o mal almacenados.

Nota: Es importante controlar que las pruebas se realicen correctamente, haciendo especial hincapié en la eliminación incorrecta de muestras, los errores de carga y los errores de pipeteo.

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.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Condiciones de envío

El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit se suministra en hielo seco y debe seguir congelado a la llegada. En caso de que el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit no esté congelado a la llegada, de que el embalaje externo se haya abierto durante el transporte o de que el envío no incluya la nota de embalaje, el manual o los reactivos, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN o con su distribuidor local (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Condiciones de almacenamiento

Una vez recibido, almacene inmediatamente el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit en un congelador a una temperatura constante de entre -30 y -15 °C y protéjalo de la luz. Los primers Scorpions (así como todas las moléculas marcadas con fluorescencia) deben protegerse de la luz para evitar el blanqueamiento y la pérdida de rendimiento. Cuando se almacena en las condiciones recomendadas en el embalaje original, el kit es estable hasta la fecha de caducidad que figura en la caja.

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, el periodo que transcurra primero. No es aconsejable descongelarlo y volver luego a congelarlo. Se recomienda un máximo de ocho ciclos de congelación-descongelación.

Los reactivos deben descongelarse a temperatura ambiente ($15-25$ °C) 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 instrumento 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 °C)

Nota: Este tiempo incluye tanto la configuración de la PCR como el almacenamiento.

Nota: Para garantizar una actividad y un rendimiento óptimos, los primers Scorpions (así como todas las moléculas marcadas con fluorescencia) deben protegerse de la luz para evitar el blanqueamiento.

Nota: Las muestras deben distribuirse en lotes para lograr un uso óptimo de los reactivos del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Si las muestras se analizan por separado, se utilizarán más reactivos y será necesario disminuir el número de muestras que se pueden analizar con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Manipulación y almacenamiento del 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 tejido FFPE. Los materiales de muestra se deben transportar de acuerdo con la metodología anatomopatológica estándar para garantizar la calidad del material de muestra.

Las muestras de tumores no son homogéneas y existe la posibilidad de que los datos de una muestra de tumor no coincidan con otras secciones del mismo tumor. Las muestras de tumores también pueden contener tejido no tumoral. En un principio, no se prevé que el ADN del tejido no tumoral contenga las mutaciones que detecta el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Para preparar las muestras de tejido para la extracción del ADN:

- Con los materiales y métodos estándares, fije el material de muestra de tejido en formalina con tampón neutral (Neutral Buffered Formalin, NBF) al 10 % y fije el material de muestra de tejido en parafina. Con un microtomo, corte secciones en serie de 5 µm del bloque de parafina y colóquelas en portaobjetos de vidrio.
- Recorra a un profesional cualificado (p. ej., un patólogo) para valorar la sección teñida con hematoxilina-eosina (H&E) para confirmar si hay presencia tumoral.
- No utilice las secciones teñidas para extraer el ADN.
- Conserve todos los bloques FFPE y portaobjetos a temperatura ambiente (15-25 °C). Los portaobjetos pueden conservarse a temperatura ambiente durante un máximo de 1 mes antes de la extracción del ADN.

Procedimiento

Extracción y preparación del ADN

Las características de rendimiento de este kit se han determinado mediante ADN extraído con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (n.º de cat. 60404). Se debe utilizar este kit para la preparación del ADN, si está disponible en su país. Si se utiliza el kit con funciones equivalentes QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (n.º de cat. 56404), lleve a cabo la extracción del ADN de acuerdo con las instrucciones del manual y según las recomendaciones siguientes:

- No utilice la QIAGEN Deparaffinization Solution. Utilice solamente el método xileno/etanol para desparafinización descrito en el *manual del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Asegúrese de utilizar etanol de calidad para biología molecular * en todos los pasos necesarios.
- Raspe todo el área de tejido de dos secciones y deposítelo en un tubo de microcentrifugadora etiquetado con un bisturí nuevo para cada muestra.
- La digestión de la proteinasa K (paso 11 del manual del *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) debe realizarse durante 1 hora \pm 5 minutos a una temperatura de $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- La digestión de la proteinasa K (paso 12 del manual del *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) debe realizarse durante 1 hora \pm 5 minutos a una temperatura de $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- No utilice el paso de ribonucleasa que se describe en el *manual del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Las muestras deben eluirse en 120 μl de tampón de elución (ATE) del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (paso 20 del manual del *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*).
- El ADN genómico puede conservarse a $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 semana con posterioridad a la extracción, o entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta 8 semanas antes de su uso.

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

Protocolo: Valoración de las muestras

Este protocolo se utiliza para valorar el ADN amplificable total de las muestras mediante el molde "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" del software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package para la valoración automatizada de muestras.

* No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metilacetona.

Nota: Para obtener información sobre la valoración manual de las muestras de ADN, consulte Apéndice A: *Protocolo* manual del theascreen EGFR RGQ PCR Kit.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de comenzar el procedimiento, lea el apartado Precauciones generales.
- Tómese su tiempo para familiarizarse con el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM antes de comenzar el protocolo. Lea el manual del usuario del equipo.
- No mezcle en vórtex la enzima Taq ni ninguna mezcla que contenga Taq, ya que esto puede inactivar la enzima.
- Pipetee la enzima Taq. Para ello, introduzca la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra de enzima en exceso.
- Pueden evaluarse hasta 24 muestras mediante la mezcla de reacción para control disponible.

Antes de comenzar

- Compruebe que se haya instalado el software *therascreen EGFR CE Assay Package* antes de utilizar el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM por primera vez (consulte Apéndice B: instalación del software *therascreen EGFR CE Assay Package*).
- Antes de cada uso, descongele 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.
- Mezcle todas las muestras invirtiéndolas 10 veces y centrifugue brevemente para que el contenido se deposite 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.

Procedimiento

1. Descongele la mezcla de reacción para control (CTRL), 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 1 hora como mínimo y 4,5 horas como máximo.

En la tabla 2 se indica el tiempo necesario para descongelar los reactivos y configurar la PCR, así como el tiempo de almacenamiento previo al inicio de la serie analítica.

Tabla 2. 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 h	4,5 h	Temperatura ambiente (15-25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2-8 °C	18 h

Nota: La configuración de la PCR se realiza a temperatura ambiente (15-25 °C). 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 enzima *Taq* a temperatura ambiente (15-25 °C) al mismo tiempo que los otros reactivos (consulte Almacenamiento y manipulación de reactivos). Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

2. Cuando se hayan descongelado los reactivos, mézclelos invirtiendo 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.
3. Prepare cantidades suficientes de mezcla maestra de control (mezcla de reacción para control [CTRL] más la enzima *Taq*) para las muestras de ADN, una reacción de PC para EGFR y una reacción de NTC según los volúmenes indicados en la tabla 3. Incluya reactivos para 1 muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR.

Nota: La mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios para la PCR, salvo la muestra.

Tabla 3. Preparación de la mezcla maestra de ensayo para control

Componente	Volumen
Mezcla de reacción para control (CTRL)	19,5 µl x (n + 1) *
ADN polimerasa <i>Taq</i> (<i>Taq</i>)	0,5 µl x (n + 1)
Volumen total	20 µl/reacción

* n = número de reacciones (muestras y controles). Prepare volumen suficiente de mezcla maestra para una muestra adicional (n + 1) a fin de asegurar suficiente excedente para la configuración de la PCR. El valor n no debe ser superior a 26 (24 muestras, más 2 controles).

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

- Mezcle bien la mezcla maestra pipeteando suavemente arriba y abajo 10 veces. Coloque el número adecuado de tubos en tiras en el bloque de carga según el esquema de la tabla 4. Añada inmediatamente 20 µl de mezcla maestra en cada tubo en tiras para PCR. Los tapones permanecen en el contenedor de plástico hasta que se necesitan. Para llevar a cabo la valoración de las muestras de ADN, debe añadirse la mezcla maestra para el ensayo de control a un tubo para PC, a un tubo para NTC y a un tubo para cada muestra.

Tabla 4. Disposición de los ensayos de valoración de muestras de ADN en el bloque de carga. Los números indican las posiciones en el bloque de carga y la posición final del rotor.

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

- Añada inmediatamente 5 µl de agua para NTC al tubo en la posición 2 y tápelolo.
- Añada 5 µl de cada muestra a los tubos de muestras (posiciones 3 a 26) y tápelolos.
- Añada 5 µl de PC para EGFR al tubo en la posición 1 y tápelolo.

Realice la carga o el pipeteo con cuidado para evitar errores y asegurar que el NTC, las muestras y el PC se añaden correctamente a los tubos correspondientes. Marque los

taponos de los tubos para indicar la dirección en la que se deben cargar los tubos en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

8. Después de cerrar todos los tubos de PCR, realice una comprobación visual de los niveles de llenado de los tubos de muestras para asegurarse de que la muestra se ha añadido a todos los tubos.
9. Invierta todos los tubos de PCR cuatro veces para mezclar las muestras y las mezclas de reacción.
10. Coloque los tubos en tiras de PCR en las posiciones apropiadas en el rotor de 72 pocillos según la distribución de la tabla 4.
Si el rotor no está totalmente lleno, rellene las posiciones vacías con tubos vacíos y tapados.

11. Coloque inmediatamente el rotor de 72 pocillos en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Asegúrese de que el anillo de fijación (accesorio del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) se encuentra en la parte superior del rotor para asegurar los tubos durante la serie.

Nota: Si utiliza la valoración manual de las muestras, consulte Apéndice A: *Protocolo manual del thetascreen EGFR RGQ PCR Kit*.

12. Haga doble clic en el icono “*thetascreen EGFR CE Control Run Locked Template*” (Molde bloqueado para series de control de EGFR CE de thetascreen) del escritorio del ordenador conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx para iniciar el software Rotor-Gene Q (figura 1).



Figura 1. Icono de molde bloqueado para serie de control de EGFR CE (valoración de muestras)

13. Se abre de manera predeterminada la pestaña “Setup” (Configuración) (figura 2). Confirme que el anillo de fijación esté correctamente sujeto y marque la casilla Locking Ring Attached (Anillo de fijación sujeto). Cierre la tapa del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

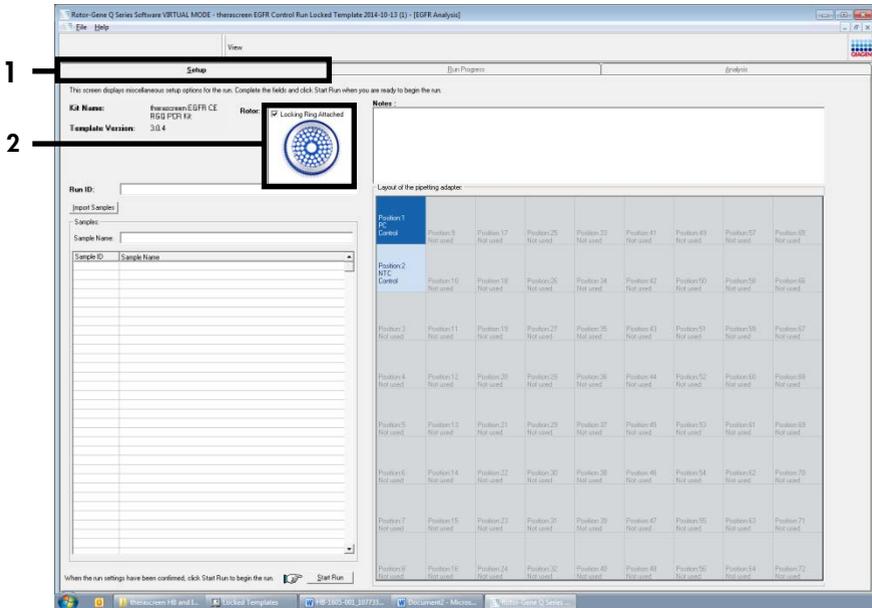


Figura 2. Pestaña “Setup” (Configuración) (1) y casilla “Locking Ring Attached” (Anillo de fijación sujeto) (2).

14. Introduzca el identificador de la serie en el campo Run ID (Identificador de la serie) de acuerdo con la convención de nomenclatura local. Escriba el nombre de la muestra en el campo Sample Name (Nombre de la muestra) según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Return (Intro).

Al hacerlo, se añade el nombre de la muestra a la lista de muestras que aparece más abajo y se le asigna un identificador “Sample ID” (ID de la muestra) (1, 2, 3, etc.). Además, se actualiza el panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo) situado a la derecha con el nombre de la muestra (figura 3).

Nota: También existe la posibilidad de importar los nombres de las muestras almacenadas en los formatos *.smp (archivo de muestras de Rotor-Gene Q) o *.csv (valores separados por comas) mediante la función Import Samples (Importar muestras). Con este método, los nombres de las muestras se introducen automáticamente.

Nota: En el panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo), compruebe que la adición de la nueva muestra aparezca resaltada con un color distinto y que el nombre de la misma aparezca en la posición de la muestra (figura 3).

Nota: Los nombres de las muestras con más de 8 caracteres no pueden mostrarse al completo en el panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo).

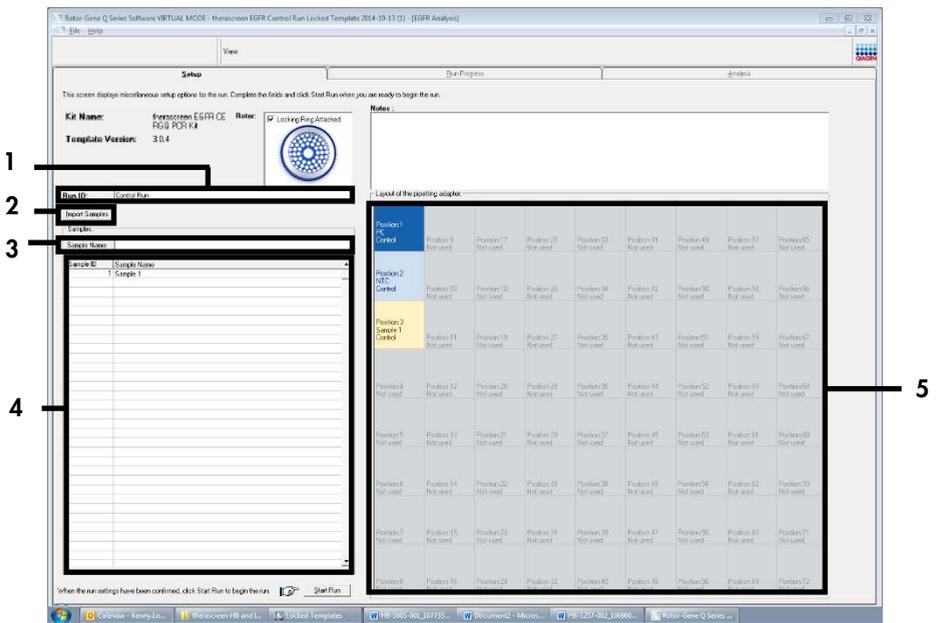


Figura 3. Introducción del “Run ID” (Identificador de la serie) y el “Sample Name” (Nombre de la muestra). 1 = Campo de diálogo “Run ID” (Identificador de la serie); 2 = Panel “Import Samples” (Importar muestras); 3 = Campo de diálogo “Sample Name” (Nombre de la muestra); 4 = “Sample List” (Lista de muestras); 5 = Panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo).

15. Repita el paso 14 para introducir los nombres de todas las muestras adicionales (figura 4).

Nota: Para editar el nombre de una muestra, haga clic en la opción Sample Name (Nombre de la muestra) de la lista de muestras para que la muestra seleccionada aparezca en el campo Sample Name (Nombre de la muestra) anterior. Modifique el nombre de la muestra según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Return (Intro) para actualizar el nombre.

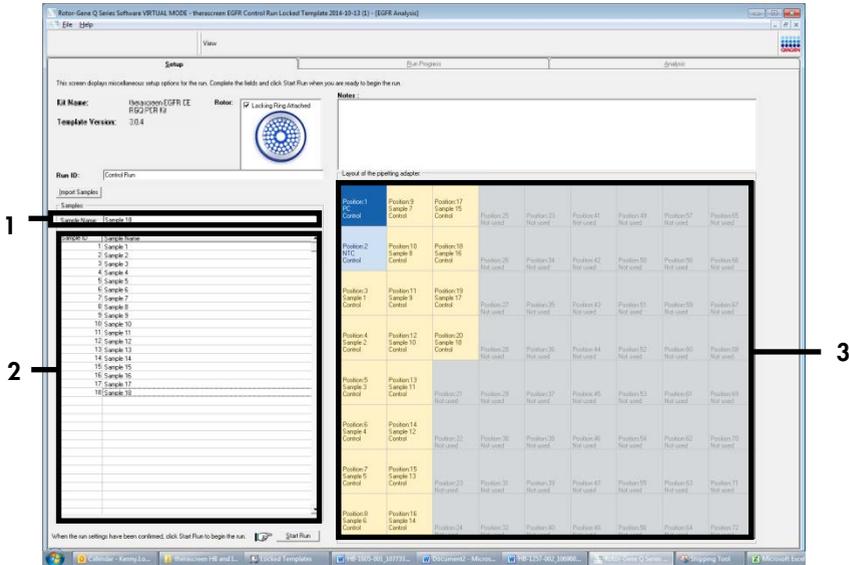


Figura 4. Introducción de nombres de muestra adicionales en el campo “Sample Name” (Nombre de la muestra). 1 = cuadro de diálogo “Sample Name” (Nombre de la muestra); 2 = lista de muestras; 3 = panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo).

16. Cuando haya terminado de introducir todos los nombres de las muestras, compruebe que sean correctos. Si es necesario, añada cualquier información adicional en el campo Notes (Notas) y, a continuación, haga clic en Start Run (Iniciar la serie) (figura 5).

Nota: Si queda alguna posición del rotor sin utilizar, aparecerá un mensaje de “Warning” (Advertencia) (figura 5) para recordar al usuario que deben ocuparse todas las posiciones sin utilizar del rotor con tubos vacíos tapados. Compruebe que todas las posiciones sin utilizar del rotor contengan un tubo vacío tapado y haga clic en OK (Aceptar) para continuar. Se abre la ventana “Save As” (Guardar como).

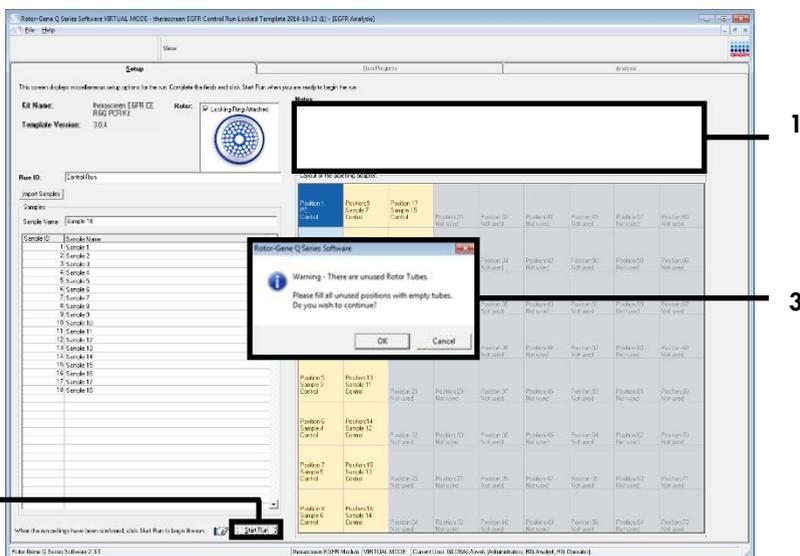
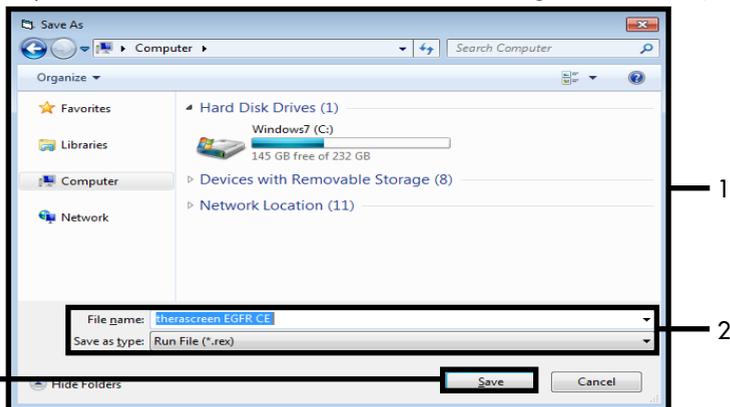


Figura 5. Cuadro de diálogo “Notes” (Notas; 1), botón “Start Run” (Iniciar la serie, 2) y mensaje “Warning” (Advertencia) sobre las posiciones sin utilizar del rotor (3).

17. Seleccione un nombre de archivo adecuado y guarde la serie de PCR como un archivo de ejecución *.rex en la ubicación seleccionada. Haga clic en Save (Guardar) (figura 6).



● **Figura 6. Ventana “Save As” (Guardar como) (1). 2 = campos “File Name” (Nombre de archivo) y “Save as type” (Guardar como tipo), 3 = “Save” (Guardar).**

Comienza la serie de PCR.

Nota: Cuando empieza la serie, se abre la pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie) para mostrar el registro de la temperatura y el tiempo restante para finalizar la serie (figura 7).

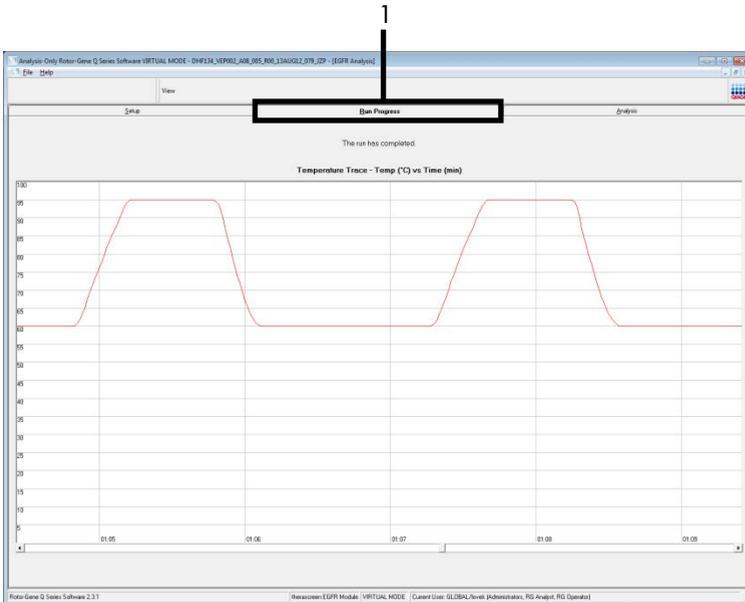


Figura 7. Pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie, 1).

Nota: Una vez finalizada la serie, se abre la pestaña "Analysis" (Análisis). Si la pestaña "Analysis" (Análisis) no se abre, haga clic en la pestaña "Analysis" (Análisis) (figura 8).

Nota: Encontrará una explicación sobre el método de cálculo empleado en el apartado "Interpretación de los resultados (automática)".

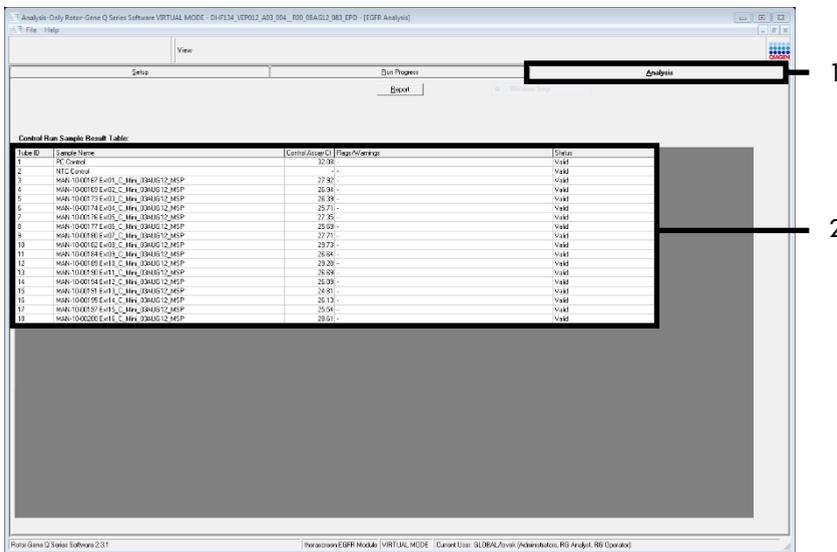


Figura 8. Pestaña “Analysis” (Análisis) (1) e informe de los resultados (2 = Tabla “Control Run Sample Result Table” [Tabla de resultados de la muestra de la serie de control]).

Los resultados de control se presentan de la siguiente manera en la tabla “Control Run Sample Result Table” (Tabla de resultados de la muestra de la serie de control) (figura 8). Controles de la serie (PC y NTC, posiciones 1 y 2 de tubos respectivamente). Si los resultados están dentro de los intervalos aceptables, se indica “Valid” (Válido). De lo contrario, se muestra “Invalid” (No válido).

Un valor de $C_T > 31,10$ para la reacción de control de la muestra genera un resultado “Invalid” (No válido). La cantidad de ADN no es suficiente para realizar el análisis de la mutación. Es necesario volver a analizar la muestra. Si la cantidad de ADN sigue siendo insuficiente, extraiga más tejido tumoral si es posible.

Un valor de $C_T < 23,70$ para la reacción de control de la muestra genera un resultado "Invalid" (No válido). La concentración de ADN es demasiado alta para realizar el análisis de la mutación. Diluya la muestra con agua exenta de nucleasas (Dil.) y repita el análisis. Diluya hasta obtener un valor de C_T en el intervalo 23,70-31,10. Una dilución 1:1 aumenta el valor de C_T en aproximadamente 1,0.

Un valor de C_T para la reacción de control de la muestra dentro del intervalo 23,70-31,10 ($23,70 \leq C_T \text{ de control} \leq 31,10$) genera un resultado "Valid" (Válido). La concentración de ADN es la adecuada para realizar el análisis de mutación.

Nota: Si fuera necesario volver a realizar una extracción o una dilución, repita la reacción de control para confirmar que la concentración de ADN es la adecuada para realizar el análisis.

18. Haga clic en Report (Informe) para generar un archivo de informe. Se abre la ventana "Report Browser" (Explorador de informes). En el apartado "Templates" (Moldes), seleccione EGFR CE Analysis Report (Informe del análisis de EGFR CE) y, a continuación, haga clic en Show (Mostrar) (figura 9).

Nota: Para guardar los informes en otra ubicación en formato de archivo Web, haga clic en Save As (Guardar como) en la esquina superior izquierda de cada informe.

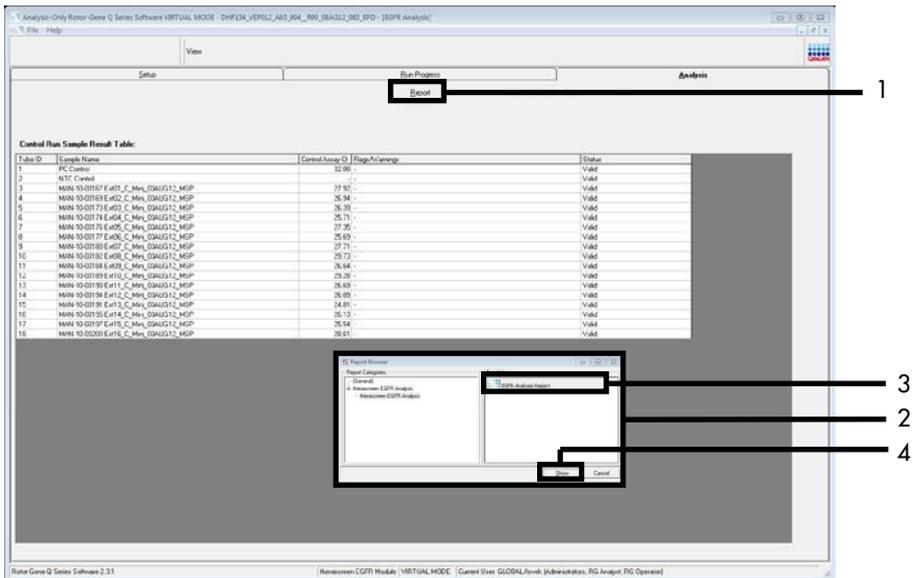


Figura 9. Selección del "EGFR CE Analysis Report" (Informe de análisis de EGFR CE). 1 = "Report" (Informe), 2 = ventana "Report Browser" (Explorador de informes), 3 = selección de "EGFR Analysis Report" (Informe de análisis de EGFR), 4 = "Show" (Mostrar).

Protocolo: detección de mutaciones de EGFR

Este protocolo está diseñado para la detección de mutaciones de EGFR. Cuando una muestra se considera correcta según la evaluación de muestras de ADN, se puede analizar mediante los ensayos de mutación de EGFR con software automatizado.

Nota: Para obtener información sobre la detección manual de mutaciones, consulte Apéndice A: *Protocolo* manual del theascreen EGFR RGQ PCR Kit.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de comenzar el procedimiento, lea el apartado Precauciones generales.
- Tómese su tiempo para familiarizarse con el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM antes de comenzar el protocolo. Lea el manual del usuario del equipo.
- Las muestras se pueden analizar con los ensayos de mutación de EGFR siempre y cuando hayan superado el proceso de valoración de muestras de ADN.
- Para utilizar el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit de forma eficaz, es preciso agrupar las muestras en lotes de siete. Un tamaño de lote inferior implica una capacidad de análisis de muestras inferior con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Las muestras deben analizarse con todas las mezclas de reacción suministradas en el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- No mezcle en vórtex la enzima Taq ni ninguna mezcla que contenga Taq, ya que esto puede inactivar 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.

Antes de comenzar

- Compruebe que se haya instalado el software *therascreen* EGFR CE Assay Package antes de utilizar el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM por primera vez (consulte Apéndice B: instalación del software *therascreen* EGFR CE Assay Package).
- Antes de cada uso, deben descongelarse completamente todos los reactivos durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 4,5 horas a temperatura ambiente (15-25 °C), mezclarlos invirtiendo 10 veces y centrifugarlos brevemente para depositar el contenido 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.
- 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.

Procedimiento

1. Descongele todos los tubos de mezcla de reacción, agua para NTC y el control positivo (Positive Control, PC) de EGFR a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 1 hora como mínimo y 4,5 horas como máximo.

En la tabla 5 se indica el tiempo necesario para descongelar los reactivos y configurar la PCR, así como el tiempo de almacenamiento previo al inicio de la serie analítica.

Tabla 5. 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 h	4,5 h	Temperatura ambiente (15-25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2-8 °C	18 h

Nota: La configuración de la PCR se realiza a temperatura ambiente (15-25 °C). 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 enzima *Taq* (tubo para *Taq*) a temperatura ambiente (15-25 °C) a la vez que el resto de los reactivos (consulte Almacenamiento y manipulación de reactivos). Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

2. Cuando se hayan descongelado los reactivos, mézclelos invirtiendo 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.
3. Prepare cantidades suficientes de mezclas maestras de ensayo (mezcla de reacción para ensayo más la enzima *Taq*) para las muestras de ADN, un control positivo (Positive Control, PC) para EGFR y una reacción de control sin molde (No Template Control, NTC) según los volúmenes indicados en la tabla 6. Incluya reactivos para 1 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, salvo la muestra.

Tabla 6. Preparación de las mezclas maestras del ensayo

Ensayo	Tubo para mezcla de reacción	Volumen de mezcla de reacción	Volumen de <i>Taq</i> ADN polimerasa (tubo para <i>Taq</i>)
Control	CTRL	19,5 µl x (n + 1)*	0,5 µl x (n + 1)*
T790M	T790M	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
Deleciones	Del	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
L858R	L858R	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
L861Q	L861Q	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
G719X	G719X	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
S768I	S768I	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)
Inserciones	Ins	19,5 µl x (n + 1)	0,5 µl x (n + 1)

* n = número de reacciones (muestras y controles). Prepare volumen suficiente de mezcla maestra para una muestra adicional (n + 1) a fin de asegurar suficiente excedente para la configuración de la PCR. El valor n no debe ser superior a siete (más los controles), puesto que siete es el número máximo de muestras por serie analítica.

4. Mezcle bien la mezcla maestra de ensayo pipeteando suavemente arriba y abajo 10 veces. Coloque el número adecuado de tubos en tiras en el bloque de carga según el esquema de la tabla 7. Añada inmediatamente 20 µl de la mezcla maestra de ensayo correspondiente en cada tira de tubos para PCR.

Los tapones permanecen en el contenedor de plástico hasta que se necesitan.

Tabla 7. Disposición de los ensayos de control y mutación en el bloque de carga. Los números indican las posiciones en el bloque de carga y la posición final del rotor.

Ensayo	<u>Posición</u>								
	Controles		1	2	Número de muestras		5	6	7
	PC	NTC			3	4			
Control	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
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
Inserciones	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. Añada inmediatamente 5 µl de agua para NTC a los tubos de las posiciones 9-16 y tápelos.

6. Añada 5 µl de cada muestra a los tubos de muestras (posiciones de tubos 17-24, 25-32, 33-40, 41-48, 49-56, 57-64 y 65-72) y tápelos.

7. Añada 5 µl de PC para EGFR a los tubos en la posición 1-8 y tápelos.

Realice la carga o el pipeteo con cuidado para evitar errores y asegurar que el NTC, las muestras y el PC para EGFR se añaden correctamente a los tubos correspondientes.

Cada tubo debería contener un volumen de reacción total de 25 μ l (20 μ l de mezcla maestra de ensayo preparada en el paso 3 [tabla 6] más 5 μ l de NTC/muestra/PC). Los números indican las posiciones en el bloque de carga y la posición final del rotor.

Marque los tapones de los tubos para indicar la dirección en la que se deben cargar los tubos en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

8. Después de cerrar todos los tubos de PCR, realice una comprobación visual de los niveles de llenado de los tubos de muestras para asegurarse de que la muestra se ha añadido a todos los tubos.
9. Invierta todos los tubos de PCR 4 veces para mezclar las muestras y las mezclas de reacción.
10. Coloque los tubos en tiras de PCR en las posiciones apropiadas en el rotor de 72 pocillos según la distribución de la tabla 7.

Cada serie de PCR admite un máximo de 7 muestras. Si el rotor no está totalmente lleno, rellene las posiciones vacías con tubos vacíos y tapados.

11. Coloque inmediatamente el rotor de 72 pocillos en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Asegúrese de que el anillo de fijación (accesorio del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) se encuentra en la parte superior del rotor para asegurar los tubos durante la serie.

Nota: Si utiliza la detección manual de mutación de EGFR, consulte el apartado Apéndice A: Protocolo manual del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

12. Inicie el software Rotor-Gene Q. Para ello, haga doble clic en el icono “*therascreen* EGFR CE Locked Template” (Molde bloqueado de EGFR CE de *therascreen*) del escritorio del ordenador conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (figura 10).



Figura 10. Icono de EGFR CE Locked Template (Molde bloqueado de EGFR CE) (detección de mutaciones de EGFR)

13. Se abre de manera predeterminada la pestaña “Setup” (Configuración) (figura 11). Confirme que el anillo de fijación esté correctamente sujeto y marque la casilla Locking Ring Attached (Anillo de fijación sujeto). Cierre la tapa del equipo Rotor-Gene Q MDx 5 plex HRM.

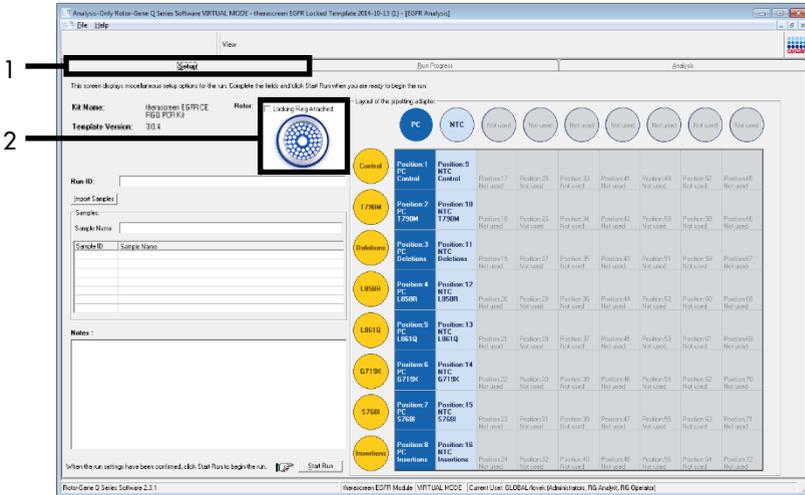


Figura 11. Pestaña “Setup” (Configuración) (1) y casilla “Locking Ring Attached” (Anillo de fijación sujeto) (2).

14. Introduzca el identificador de la serie en el campo Run ID (Identificador de la serie) de acuerdo con la convención de nomenclatura local. Escriba el nombre de la muestra en el campo Sample Name (Nombre de la muestra) según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Return (Intro).

Al hacerlo, se añade el nombre de la muestra a la lista de muestras que aparece más abajo y se le asigna un identificador “Sample ID” (ID de la muestra) (1, 2, 3, etc.). Además, se actualiza el panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo) situado a la derecha con el nombre de la muestra (figura 12).

Nota: También existe la posibilidad de importar los nombres de las muestras almacenadas en los formatos *.smp (archivo de muestras de Rotor-Gene Q) o *.csv (valores separados por comas) mediante el botón Import Samples (Importar muestras). Con este método, los nombres de las muestras se introducen automáticamente.

Nota: En el panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo), compruebe que la adición de la nueva muestra aparezca resaltada con un color distinto y que el nombre de la misma aparezca en la posición de la muestra (figura 12).

Nota: Pueden añadirse un máximo de 7 muestras. Los identificadores de las muestras (en los círculos de las muestras) se asignan automáticamente del 1 al 7.

Nota: Los nombres de las muestras con más de 8 caracteres no pueden mostrarse al completo en el panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo).

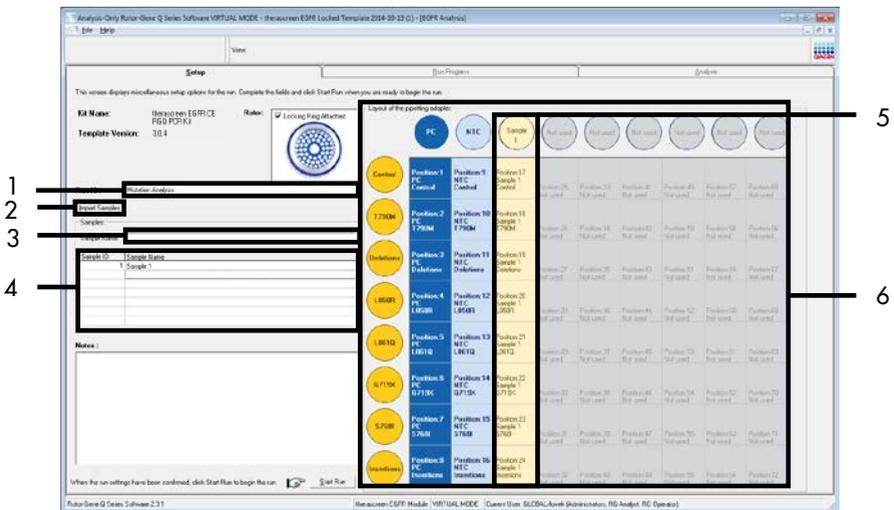


Figura 12. Introducción del “Run ID” (Identificador de la serie) y el “Sample Name” (Nombre de la muestra). 1 = cuadro de diálogo “Run ID” (Identificador de la serie), 2 = botón “Import Samples” (Importar muestras), 3 = cuadro de diálogo “Sample Name” (Nombre de la muestra), 4 = lista de muestras, 5 = panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo), 6 = círculo de la muestra resaltado y columna de 8 ensayos.

15. Repita el paso 14 para introducir los nombres de todas las muestras adicionales (figura 13).

Nota: Para editar el nombre de una muestra, haga clic en la opción Sample Name (Nombre de la muestra) de la lista de muestras para que la muestra seleccionada aparezca en el campo Sample Name (Nombre de la muestra) anterior. Modifique el nombre de la muestra según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Return (Intro) para actualizar el nombre.

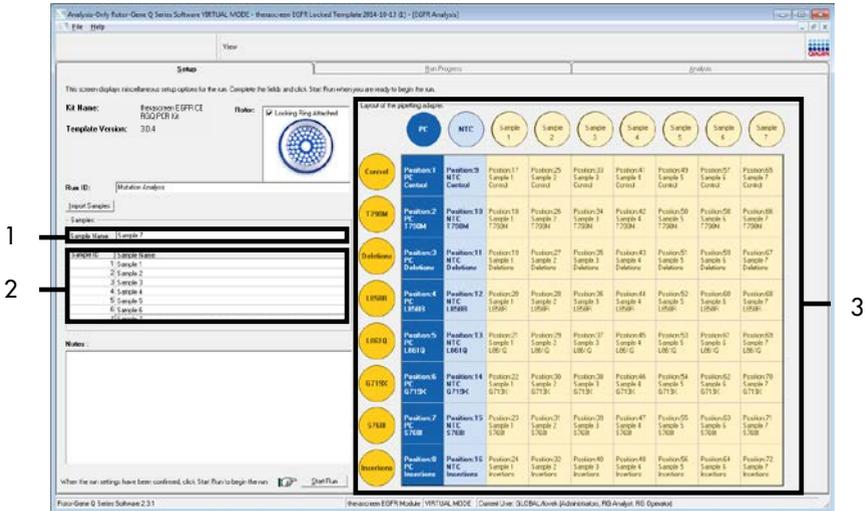


Figura 13. Introducción de nombres de muestra adicionales en el campo "Sample Name" (Nombre de la muestra). 1 = cuadro de diálogo "Sample Name" (Nombre de la muestra); 2 = "Sample List" (Lista de muestras); 3 = panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo).

16. Cuando haya terminado de introducir todos los nombres de las muestras, compruebe que sean correctos. Si es necesario, añada cualquier información adicional en el campo Notes (Notas) y, a continuación, haga clic en Start Run (Iniciar la serie) (figura 14).

Nota: Si queda alguna posición del rotor sin utilizar, aparecerá un mensaje de "Warning" (Advertencia) (figura 14) para recordar al usuario que deben ocuparse todas las posiciones sin utilizar del rotor con tubos vacíos tapados. Compruebe que todas las posiciones sin utilizar del rotor contengan un tubo vacío tapado y haga clic en OK (Aceptar) para continuar.

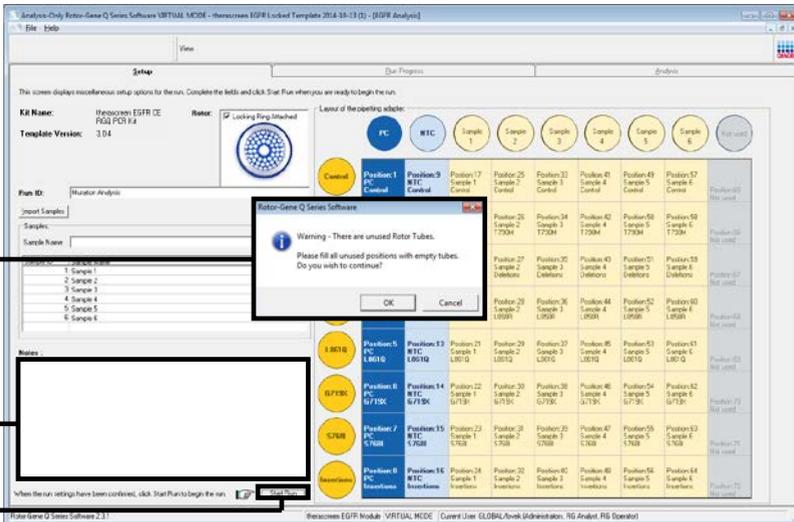


Figura 14. Cuadro de diálogo “Notes” (Notas, 1), botón “Start Run” (Inicie la serie, 2) y mensaje “Warning” (Advertencia) sobre las posiciones sin utilizar del rotor (3).

17. Se abre la ventana “Save As” (Guardar como). Seleccione un nombre de archivo adecuado y guarde la serie de PCR como un archivo ejecutable *.rex en la ubicación seleccionada. Haga clic en Save (Guardar) (figura 15).

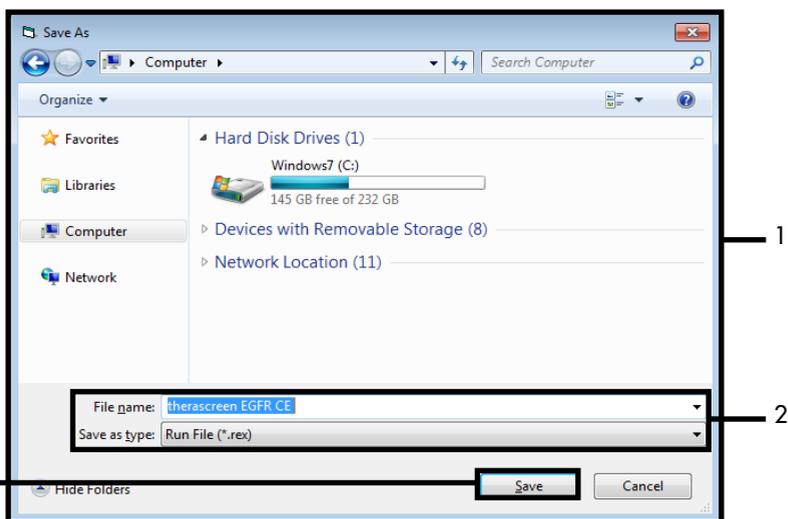


Figura 15. Ventana "Save As" (Guardar como) (1).2 = Campos "File Name" (Nombre de archivo) y "Save as type" (Guardar como tipo), 3 = "Save" (Guardar).

Comienza la serie de PCR.

Nota: Cuando empieza la serie, se abre la pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie) para mostrar el registro de la temperatura y el tiempo restante para finalizar la serie (figura 16).

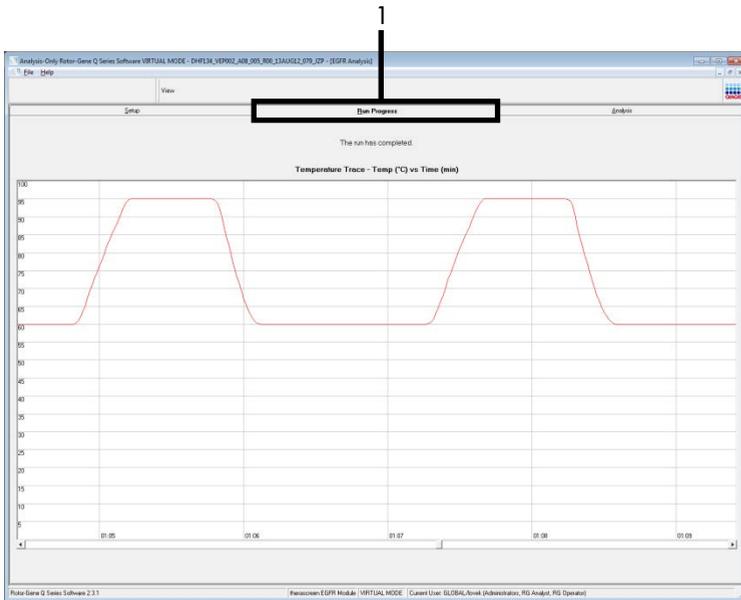


Figura 16. Pestaña “Run Progress” (Progreso de la serie).

Una vez finalizada la serie, se abre la pestaña “Analysis” (Análisis).

Nota: Si la pestaña “Analysis” (Análisis) no se abre, haga clic en la pestaña “Analysis” (Análisis) (figura 17).

Nota: Encontrará una explicación sobre el método de cálculo empleado en el apartado “Interpretación de los resultados (automática)”.

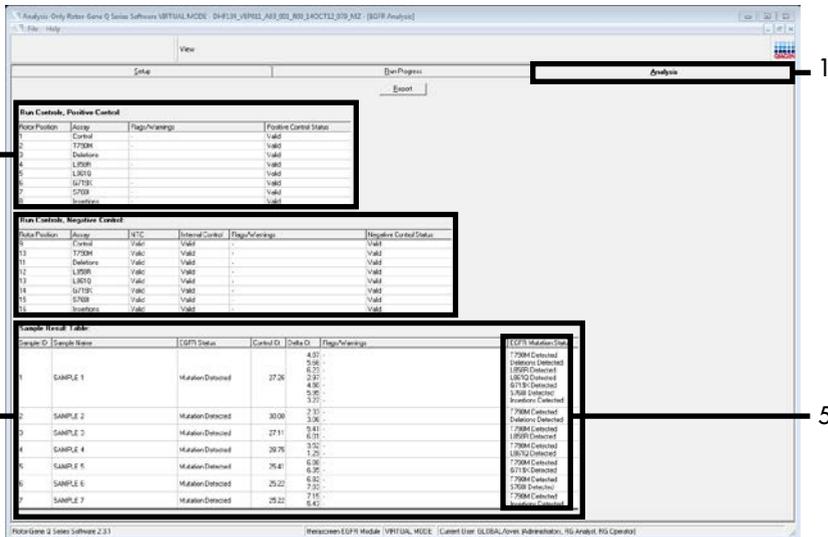


Figura 17. Pestaña "Analysis" (Análisis) (1) e informe de los resultados. 2 = panel "Run Controls, Positive Control" (Controles de la serie, control positivo), 3 = panel "Run Controls, Negative Control" (Controles de la serie, control negativo), 4 = "Sample Result Table" (Tabla de resultados de la muestra), 5 = panel "Mutation Status" (Estado de la mutación).

18. Los resultados del ensayo se presentan de la siguiente manera (figura 18).

Run Controls, Positive Control (Controles de la serie, control positivo): Si los resultados se hallan dentro del rango aceptable, en la columna "Positive Control Status" (Estado del control positivo) aparecerá un resultado "Valid" (Válido); de lo contrario, aparecerá un resultado "Invalid" (No válido).

Run Controls, Negative Control (Controles de la serie, control negativo): Si tanto el resultado para "NTC" como para "Internal Control" (Control interno) se hallan dentro de los intervalos aceptables, aparecerá un resultado "Valid" (Válido) en la columna "Negative Control Status" (Estado del control negativo); de lo contrario, aparecerá un resultado "Invalid" (No válido).

Sample Result Table (Tabla de resultados de la muestra): En la columna "EGFR Mutation Status" (Estado de la mutación de EGFR) se muestran las mutaciones específicas detectadas en las muestras positivas para la mutación.

19. Haga clic en Report (Informe) para generar un archivo de informe. Se abre la ventana "Report Browser" (Explorador de informes). En el apartado Templates (Moldes), seleccione EGFR CE Analysis Report (Informe del análisis de EGFR CE) y, a continuación, haga clic en Show (Mostrar) (figura 18).

Nota: Para guardar un informe en otra ubicación en formato de archivo Web, haga clic en Save As (Guardar como) en la esquina superior izquierda de cada informe.

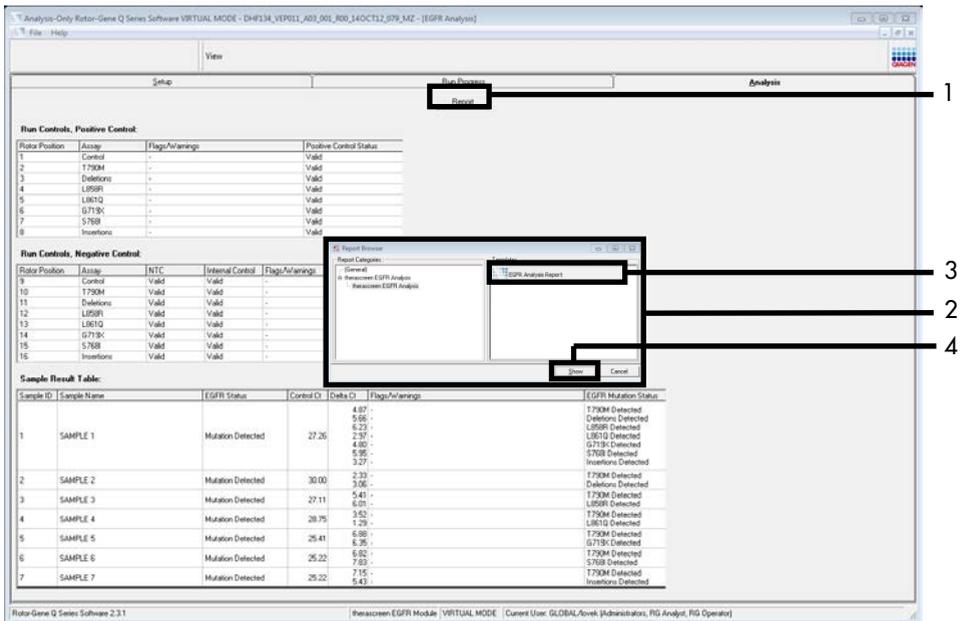


Figura 18. Selección del "EGFR CE Analysis Report" (Informe de análisis de EGFR CE). 1 = "Report" (Informe), 2 = panel "Report Browser" (Explorador de informes), 3 = "EGFR CE Analysis Report" (Informe del análisis de EGFR CE), 4 = "Show" (Mostrar).

Interpretación de los resultados (automática)

El software *therascreen* EGFR Assay Package realiza automáticamente el análisis y la identificación de las mutaciones en cuanto finaliza la serie analítica. A continuación, se explican los métodos empleados por el software *therascreen* EGFR Assay Package para realizar el análisis y la identificación de las mutaciones.

Nota: Para obtener información sobre el análisis manual de los resultados, consulte el apartado Interpretación de los resultados (manual).

El ciclo de PCR en el que la fluorescencia de una determinada reacción alcanza el valor umbral se define como valor de C_T . Los valores de C_T indican la cantidad de ADN específico introducido. Los valores de C_T bajos indican niveles más altos de ADN introducido, mientras que los valores de C_T altos indican niveles más bajos de ADN introducido. Las reacciones con un valor de C_T se consideran positivas para la amplificación.

El software Rotor-Gene Q interpola las señales de fluorescencia registradas entre dos valores cualesquiera. Por lo tanto, los valores de C_T pueden ser cualquier número real (no solamente enteros) comprendido entre 0 y 40. Para el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, el valor umbral definido es 0,075 unidades de fluorescencia relativas para el canal Green (FAM) y 0,02 para el canal Yellow (HEX). Estos valores se configuran automáticamente en el software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package. Se revisan los controles de la serie (PC, NTC e IC) para asegurar la obtención de valores de C_T aceptables y que las reacciones se realicen correctamente.

Los valores de ΔC_T de la muestra se calculan para ensayo de mutación mediante la ecuación:

$$\Delta C_T = [\text{valor de } C_T \text{ del ensayo de mutación}] - [\text{valor de } C_T \text{ del ensayo de control}]$$

Las muestras se clasifican como positivas para la mutación cuando su valor de ΔC_T es inferior o igual al valor de ΔC_T de corte de dicho ensayo. Por encima de este valor, se considera que la muestra no alcanza el porcentaje de mutación detectable por el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (por encima del límite de los ensayos) o que la muestra es negativa para la mutación, lo que se indicaría con el resultado "No Mutation Detected" (Mutación no detectada).

La ausencia de amplificación en las reacciones para mutación se clasifica como "No Mutation Detected" (Mutación no detectada). Se prevé que los valores de ΔC_T calculados a partir de la amplificación del fondo sean superiores a los valores de ΔC_T de corte, en cuyo caso, la muestra se clasifica como "No Mutation Detected" (Mutación no detectada).

Los resultados del ensayo pueden ser "Mutation Detected" (Mutación detectada), "No Mutation Detected" (Mutación no detectada), "Invalid" (No válido) o "Run Control Failed" (Control de la serie erróneo) si alguno de los controles de la serie da error. En el caso de las muestras positivas para la mutación, se indican las mutaciones específicas detectadas. Un tumor puede contener más de una mutación. En dichos casos, se indica más de una mutación.

Indicadores del software *therascreen* EGFR Assay Package para Rotor-Gene Q

La tabla 8 (en la página siguiente) recopila los posibles indicadores que puede generar el software *therascreen* EGFR Assay Package para Rotor-Gene Q, su significado y las acciones que deben llevarse a cabo.

Los nombres de los marcadores se generan de manera que proporcionen información sobre el componente afectado del kit, la muestra o el control afectados y el modo del error.

Por ejemplo:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = El ensayo de control (CTRL_ASSAY) del control positivo (Positive Control, PC) da error (FAIL).
- NTC_INT_CTRL_FAIL = El control interno (INT_CTRL) del control sin molde (No Template Control, NTC) da error (FAIL).
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = El ensayo de control (CTRL) de la muestra (SAMPLE) tiene una concentración elevada (HIGH_CONC).

Tabla 8. Indicadores, significados y acciones

Indicador	Significado	Acción
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Serie de PCR no válida: el valor de C_T de FAM está fuera del intervalo para el control positivo de la reacción para control.	Repita toda la serie de PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Serie de PCR no válida: el valor de C_T de FAM está fuera del intervalo para una o más reacciones para control de mutación.	Repita toda la serie de PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia del control positivo (mezcla de reacción para control).	Repita toda la serie de PCR.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia del control positivo (mezcla de reacción para la mutación).	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Serie de PCR no válida: control interno por encima del intervalo para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Serie de PCR no válida: control interno por debajo del intervalo para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INVALID_CT	Serie de PCR no válida: valor de FAM no válido (inferior al límite) para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INVALID_DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Muestra no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control de la muestra.	Configure una PCR nueva para repetir las muestras relevantes.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Muestra no válida: valor de C_T de FAM demasiado bajo para el control de la muestra.	Diluya la muestra para aumentar el valor de C_T del control. Calcule la dilución teniendo en cuenta que una dilución 1:1 con el agua suministrada en el kit permite aumentar el valor de C_T en 1,0; cuando haya diluido la muestra, configure una nueva serie analítica de valoración de la mutación para repetir la muestra. Si ha diluido la muestra a partir de una serie analítica de valoración de muestras de ADN, continúe directamente con la serie para detección de mutaciones de EGFR con la muestra diluida.

Tabla 8. Indicadores, significados y acciones que se deben realizar (continuación)

Indicador	Significado	Acción
SAMPLE_CTRL_FAIL	Muestra no válida: valor de C_T de FAM demasiado alto para la reacción para control de la muestra.	<p>Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si la muestra sigue sin ser válida al repetir la serie de PCR y la cantidad de ADN aún no es suficiente, extraiga dos cortes tisulares de FFPE adicionales (si están disponibles). Configure una nueva serie de PCR para analizar esta extracción. Si la muestra no es válida, repita la serie de PCR en la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.</p>
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Valor de C_T demasiado alto (o ausencia de C_T) para el control interno (HEX), canal FAM negativo para la mutación.	<p>Si las muestras generan un indicador "SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID" con una mutación detectada (o no detectada) en una mezcla de reacción para mutación clínicamente relevante, comunique los resultados y no hay necesidad de realizar otro análisis.</p> <p>Diluya la muestra con el agua suministrada en el kit teniendo en cuenta que una dilución 1:1 aumentará el valor de CT de la reacción de control en 1,0 y asegurándose de que el volumen final sea >40 µl (p. ej., 40 µl de ADN y 40 µl de agua del tubo marcado como DIL).</p> <p>Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado sigue sin ser válido al repetir la serie de PCR, extraiga la muestra de dos secciones FFPE adicionales. Configure una nueva serie de PCR para analizar esta extracción.</p> <p>Si la segunda extracción no es válida, dilúyala según el proceso descrito anteriormente.</p> <p>Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.</p>
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Tubo para mutación no válido: el valor de C_T de HEX es demasiado bajo para la muestra (control interno).	<p>Si las muestras generan un indicador "SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID" con una mutación detectada (o no detectada) en una mezcla de reacción para mutación clínicamente relevante, comunique los resultados y no hay necesidad de realizar otro análisis.</p> <p>Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si sigue siendo no válida al repetir la serie de PCR, obtenga dos secciones de tejido FFPE adicionales (si están disponibles). Configure una nueva serie de PCR para analizar esta extracción. Si aún no es válida, repita la serie de PCR en la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.</p>

Tabla 8. Indicadores, significados y acciones que se deben realizar (continuación)

Indicador	Significado	Acción
SAMPLE_INVALID_DATA	Tubo para mutación no válido: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control interno.	<p>Si las muestras generan un indicador "SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID" con una mutación detectada (o no detectada) en una mezcla de reacción para mutación clínicamente relevante, comunique los resultados y no hay necesidad de realizar otro análisis.</p> <p>Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si sigue siendo no válida al repetir la serie de PCR, obtenga dos secciones de tejido FFPE adicionales (si están disponibles). Configure una nueva serie de PCR para analizar esta extracción. Si aún no es válida, repita la serie de PCR en la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.</p>
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Una o más mutaciones de la muestra son positivas, a la vez que una o más mutaciones de la misma muestra no son válidas.	<p>Si las muestras generan un indicador "SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID" con una mutación detectada (o no detectada) en una mezcla de reacción para mutación clínicamente relevante, comunique los resultados y no hay necesidad de realizar otro análisis.</p> <p>Si las muestras generan un indicador "SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID" con un resultado "INVALID" (No válido) obtenido a partir de una mezcla de reacción para mutación clínicamente relevante, vuelva a analizar la muestra con todas las mezclas de reacción según la acción específica del indicador de resultado no válido.</p> <p>Si se genera un indicador "SAMPLE_INT_CTRL_FAIL" en combinación con otro indicador para la muestra en cuestión, diluya la muestra del indicador "SAMPLE_INT_CTRL_FAIL". Configure una nueva serie de PCR y vuelva a analizar la muestra.</p> <p>Si las muestras generan un indicador "SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID" con un resultado "INVALID" (No válido) obtenido a partir de una mezcla de reacción para mutación clínicamente relevante al repetir la serie de PCR, extraiga la muestra de dos secciones FFPE adicionales. Configure una nueva serie de PCR con todas las mezclas de reacción para analizar esta extracción.</p> <p>Si la muestra vuelve a generar un resultado no válido para una mezcla de reacción para mutación clínicamente relevante, repita el análisis de la muestra con todas las mezclas de reacción según la acción específica del indicador de resultado no válido. Si se genera un indicador "SAMPLE_INT_CTRL_FAIL" en combinación con otro indicador para la muestra en cuestión, diluya la muestra del indicador "SAMPLE_INT_CTRL_FAIL". Configure una nueva serie de PCR y vuelva a analizar la muestra.</p> <p>Si tras la repetición se obtiene el indicador "SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID", el estado de mutación de la muestra se considera indeterminado.</p>

Guía de 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 (Frequently Asked Questions, FAQ) 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

Las muestras de NTC generan resultados positivos en el canal Green FAM

Se ha producido contaminación durante la preparación de la PCR.

Repita la PCR con reactivos nuevos en réplicas.

Si fuera posible, cierre los tubos de PCR justo después de añadir la muestra que va a analizarse.

Compruebe periódicamente que el espacio y los instrumentos de trabajo no estén contaminados.

Ausencia de señal en el control positivo para EGFR

- | | |
|--|--|
| a) El canal de fluorescencia seleccionado para el análisis de 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. 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 almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplan las instrucciones indicadas en el apartado "Almacenamiento y manipulación de reactivos" (página 18) | 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 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. |

Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del *therascreen* EGFR 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 y no han de 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.

El producto es para uso exclusivo en el termociclador para real-time PCR 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 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.

Es importante que la cantidad y calidad del ADN de la muestra se evalúe antes de realizar el análisis de la muestra con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. La mezcla de reacción de control adicional se suministra para determinar si el valor de C_T es aceptable para el ensayo. Las lecturas de absorbancia no deben utilizarse, puesto que no correlacionan los valores de C_T en las muestras de ADN fragmentadas.

Los primers en la mezcla de reacción para deleciones de EGFR se han diseñado para tratar varias deleciones del exón 19, abarcando 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 14 deleciones específicas dentro del exón 19 (consulte la lista de la tabla 1 de este manual), es posible amplificar las mutaciones adicionales (incluidas, entre otras, las deleciones del exón 19 adicionales, las inserciones del exón 19 y la mutación L747P) mediante el conjunto de primers de deleciones.

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

De forma adicional, es posible detectar la mutación L858Q mediante el ensayo L858R. Por tanto, si está presente en una muestra de paciente, la mutación L858Q puede dar lugar a un resultado "L858R Detected" (L858R detectada).

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

Características de rendimiento

Rendimiento analítico

Las características de rendimiento específicas del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit se han determinado a partir de estudios realizados con materiales de muestra de tejido FFPE obtenidos de pacientes con NSCLC y líneas celulares humanas FFPE (líneas celulares FFPE). Las líneas celulares FFPE se han generado a partir de una línea celular de carcinoma de pulmón (A549) para producir líneas celulares que contengan las mutaciones de EGFR específica deseadas. Se ha utilizado ADN plasmídico cuando no se ha podido conseguir material de muestra de tejidos o líneas celulares.

Límite de blanco (Limit of Blank, LOB), intervalo de funcionamiento y valores de corte

Se han analizado un total de 417 muestras de FFPE en un estudio siguiendo la orientación de NCCLS EP17-A (2004) (12) para determinar el LOB y los valores de corte para cada ensayo de mutación. También se determinó el intervalo de funcionamiento. Se establecieron los valores de corte y se indican en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de corte establecidos para cada ensayo de mutación

Ensayo	Valor de corte (ΔC_t)
T790M	$\leq 7,40$
Delecciones	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$
L861Q	$\leq 8,90$
G719X	$\leq 8,90$
S768I	$\leq 8,90$
Inserciones	$\leq 8,00$

●
El intervalo de C_T de la reacción de control se estableció entre 23,70 y 31,10 de C_T .

Los valores de corte y los intervalos de funcionamiento del ensayo se verificaron mediante estándares y muestras de FFPE adicionales. Durante la verificación, se estudió la capacidad de los valores de corte para distinguir la mutación correcta en un fondo de ADN nativo mediante la valoración de cada ensayo con una concentración elevada de ADN genómico y ADN de mutación introducidos (consulte Reactividad cruzada). También se estudió el impacto del ADN introducido sobre la detección de la mutación (consulte Efecto del ADN introducido sobre los valores de ΔC_T).

Para valorar el rendimiento del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit en ausencia de molde y para garantizar que una muestra de blanco o una muestra con ADN nativo no genere una señal analítica que pueda indicar una concentración baja de la mutación, se evaluaron muestras sin molde y ADN nativo de EGFR obtenido de NSCLC. Los resultados demuestran la ausencia de identificaciones positivas de mutación de muestras NTC y muestras nativas de FFPE.

Efecto del ADN introducido sobre los valores de ΔC_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 demostrar que el rendimiento del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit se mantiene estable en todo el intervalo de valores de C_T de la reacción de control (23,70-31,10), se analizaron los 7 ensayos de mutación EGFR con una serie de diluciones 1:3 de 6 puntos (con ADN extraído de líneas celulares FFPE). El valor de C_T objetivo 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 ΔC_T medidos en los diferentes niveles de ADN introducido se mantuvieron coherentes en todo el intervalo de trabajo del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Reactividad cruzada

Se analizó ADN de EGFR nativo con un nivel de ADN introducido elevado con el objetivo de valorar la amplificación no específica. Los resultados indicaron que los valores de ΔC_T más bajos superaban los valores de corte establecidos, lo que indica la ausencia de amplificación no específica.

Se analizaron líneas celulares de FFPE con niveles de ADN introducido elevados con todas las muestras de reacción para valorar la posible reactividad cruzada. Los resultados pusieron de relieve que la reactividad cruzada entre reacciones para mutación no afectaba al ensayo. Todos los valores mínimos de ΔC_T fueron superiores a los respectivos valores de corte del ensayo para todas las muestras de ADN y mezclas de reacción no concordantes.

Exactitud: comparación con el método de referencia analítico

Se llevó a cabo un estudio que mostró la concordancia de la detección de mutaciones entre el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit y la secuenciación bidireccional de Sanger. En este estudio, se analizaron 360 muestras de FFPE.

Se analizaron las muestras con resultados válidos tanto con Sanger como con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit para valorar el porcentaje de concordancia positiva (Positive Percent Agreement, PPA), el porcentaje de concordancia negativa (Negative Percent Agreement, NPA) y el porcentaje de concordancia global (Overall Percent Agreement, OPA). En la tabla 10 se resumen estos porcentajes, junto con los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95 % bilaterales.

Tabla 10. Análisis del grado de concordancia

Medición	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95 %
Porcentaje de concordancia positiva	99,4 % (157/158)	96,5-100,0 %
Porcentaje de concordancia negativa	86,6 % (175/202)	81,2-91,0 %
Porcentaje de concordancia global	92,2 % (332/360)	89,0-94,8 %

Para los 28 resultados discordantes del porcentaje de concordancia global:

- 1 muestra (3,6 %) resultó nativa (es decir, no se detectó mutación) según el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, pero generó resultados de mutación detectada mediante la secuenciación Sanger.
- 27 muestras (96,4 %) resultaron positivas para la detección de mutaciones mediante el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit pero se identificaron como nativas mediante la secuenciación Sanger.

Valores del límite de detección (Limit of Detection, LOD)

Se realizó un estudio para determinar el LOD de cada una de las 29 mutaciones de EGFR. Se definió el LOD como la cantidad más baja de ADN mutado en un entorno de ADN nativo con la que una muestra mutada genera resultados positivos para la mutación en el 95 % de los resultados de las pruebas (C₉₅).

Para determinar el LOD de cada mutación, se prepararon muestras con diferentes porcentajes de mutación con concentraciones altas y bajas de ADN introducido y se analizaron con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (tabla 11). El LOD de cada ensayo se calculó por regresión logística. Para comprobar el LOD, se analizaron muestras de mutación con el LOD determinado y se verificó la tasa de pruebas positivas.

Tabla 11. LOD establecido a partir de materiales de muestra clínicos FFPE, líneas celulares FFPE o plásmidos con niveles altos y bajos de ADN introducido

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base	LOD (% de mutación)	
				Bajo	Alto
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [†]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [†]	– [†]
19	Delecciones	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 [§]		

Tabla 11. LOD establecido a partir de materiales de muestra clínicos FFPE, líneas celulares FFPE o plásmidos con niveles altos y bajos de ADN introducido (continuación de la página anterior)

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base	LOD (% de mutación)	
				Bajo	Alto
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Inserciones	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 mutaciones somáticas en casos de cáncer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

[†] Valores del LOD establecidos mediante líneas celulares

[‡] Valores del LOD establecidos mediante plásmidos

[§] Valores del LOD establecidos mediante muestras clínicas

[¶] No evaluado

Interferencia

Efectos del tejido necrótico

Los materiales de muestra clínicos FFPE de NSCLC con un contenido de tejido necrótico de hasta el 50 %, tanto para materiales de muestra nativos como positivos para la mutación EGFR, no interfirieron en los resultados de identificación del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Sustancias exógenas

Se analizaron las sustancias potencialmente interferentes presentes durante el proceso de extracción del ADN tanto en muestras mutadas como en muestras nativas con una concentración 10x: cera de parafina, xileno, etanol y proteinasa K. Los resultados mostraron que estas sustancias no interfirieron con los resultados de identificación del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Reproducibilidad

Reproducibilidad entre lotes

El sistema de análisis del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit utiliza dos kits individuales: el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit o el QIAamp DNA FFPE Tissue Kit para el aislamiento del ADN y el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit para la amplificación del ADN y la detección del estado de mutación del gen EGFR. Se mostró la reproducibilidad entre lotes y la intercambiabilidad a partir de 3 lotes del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit y 3 lotes del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. El porcentaje global de identificaciones correctas entre lotes fue del 97,8 % (317/324) para el ensayo de mutación de EGFR y del 100 % (379/379) para las muestras nativas.

Manipulación del material de muestra

Se examinó la reproducibilidad del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit a partir de secciones obtenidas de tres bloques de materiales de muestra FFPE, concretamente, de un material de muestra de mutación de delección del exón 19 (2235-2249 del15), un material de muestra de mutación L858R del exón 21 y un material de muestra nativo. Se realizaron extracciones por duplicado en 3 centros para cada material de muestra, que luego se analizaron en 3 días no consecutivos durante un periodo de 6 días, lo que supone un total de 18 puntos de datos por material de muestra. En cada centro, 2 operadores llevaron a cabo la pruebas con 1 lote del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (1 lote por centro, 3 lotes en total) en combinación con el mismo lote de los reactivos del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit en todos los centros. Todos los resultados de los materiales de muestra mutados y nativos resultaron válidos y generaron el resultado de identificación esperado (identificación correcta = 100 %, 18/18 para cada material de muestra), lo que respalda las características de reproducibilidad y repetibilidad del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit en la fase preanalítica de aislamiento del ADN.

Precisión y reproducibilidad

Se estudió la precisión y la reproducibilidad del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit mediante el análisis de ADN extraído de materiales de muestra clínicos FFPE de NSCLC o líneas celulares de FFPE, representativas de los siete ensayos de mutación del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. En el estudio también se incluyeron los materiales de muestra clínicos FFPE nativos de NSCLC (tabla 12).

Se implementó un modelo de estudio matricial para valorar la reproducibilidad del ensayo mediante el análisis de muestras en 3 laboratorios (centros), con 3 lotes del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (3 lotes en 3 centros), realizadas por 2 operadores en cada centro, en 2 equipos por centro. Cada muestra se analizó por duplicado (preparada con un nivel próximo al LOD) durante un total de 16 días. La reproducibilidad de cada mutación individual se llevó a cabo en días no consecutivos en cada centro. En la tabla 12, en la página siguiente, se muestra la proporción de identificaciones correctas.

Tabla 12. Reproducibilidad del ensayo: proporción de identificaciones correctas para las mutaciones de EGFR analizadas

Exón	Mutación	ID COSMI C*	Identificaciones		Corrección (%)	
			Correctas/Totales	Corrección (%)	IC del 95 % unilateral inferior	
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06	
19	Deleciones	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	
		Inserciones	12376	92/92	100	96,80
			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	
Nativa	—	—	77/78	98,72	94,06	

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Se utilizó un análisis de los componentes de varianza para estimar la desviación estándar y los intervalos de confianza del 95 % referentes a la variabilidad intraserial, entre series, entre días, entre lotes y entre centros. Para los componentes de la varianza, el coeficiente total de la variación (CV) fue $\leq 14,11$ % para todas las mutaciones de EGFR analizadas. Para los miembros mutados del panel, el porcentaje de CV fue $\leq 8,33$ % entre lotes, entre días e interserial. El porcentaje de CV para la variabilidad intraserial (repetibilidad/precisión) osciló entre el 5,99 % y el 13,49 %.

Rendimiento clínico

Datos de resultados clínicos: GIOTRIF®

El ensayo clínico LUX-Lung 3 era un ensayo internacional, multicéntrico, abierto y aleatorizado de fase 3 sobre el afatinib como tratamiento primario frente a la quimioterapia para pacientes con adenocarcinoma pulmonar de fase IIIB o IV que presentan una mutación activadora del gen EGFR (número NCT00949650 de ClinicalTrials.gov). Se determinó la idoneidad de los pacientes para someterse al ensayo mediante el análisis del estado mutacional del gen EGFR del paciente con el ensayo de pruebas clínicas (Clinical Trial Assay, CTA). Se realizaron pruebas retrospectivas de materiales de muestra de tejido mediante el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Se realizó un estudio puente para evaluar la concordancia entre el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit y el CTA.

Según los resultados de la prueba del CTA, 345 pacientes formaban parte del conjunto aleatorizado (afatinib: 230 pacientes; quimioterapia: 115 pacientes). El resultado de eficacia principal fue un periodo de supervivencia sin progresión (SSP), según la valoración de un comité de revisión independiente (CRI). De entre los 345 pacientes aleatorizados, se analizaron retrospectivamente muestras tumorales de 264 pacientes (afatinib: 178 pacientes; quimioterapia: 86 pacientes) mediante el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Los resultados del CRI demostraron una mejora estadísticamente significativa de la SSP para los pacientes tratados aleatoriamente con afatinib, en comparación con los tratados aleatoriamente con quimioterapia, respecto a la población global positiva para CTA y la población positiva tanto para el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit como para CTA. Los resultados de la eficacia global se resumen en la tabla 13 y en la figura 19.

Tabla 13. Ventajas clínicas de los pacientes sometidos a análisis con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit en la población del ensayo clínico LUX-Lung 3

Parámetro	Población positiva para <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit/CTA n = 264		Población positiva para CTA n = 345	
	Quimioterapia n = 86	Afatinib n = 178	Quimioterapia n = 115	Afatinib n = 230
Supervivencia sin progresión (SSP)				
Número de muertes o progresiones, N (%)	53 (61,6%)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
SSP media (meses)	6,9	11,2	6,9	11,1
IC del 95 % de la SSP media	5,3; 8,2	9,7; 13,7	5,4; 8,2	9,6; 13,6
Cociente de riesgo	0,49		0,58	
IC del 95 % del cociente de riesgo	0,35; 0,69		0,43; 0,78	
Valor P (prueba de rango logarítmico estratificada)*	<0,0001		<0,001	

* Estratificada por raza y estado mutacional del EGFR.

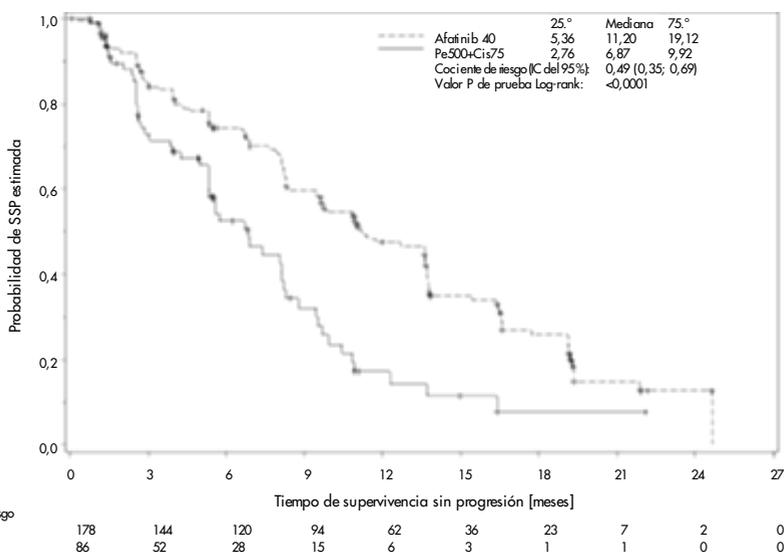


Figura 19. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia sin progresión (SSP) por un comité de revisión independiente por cada grupo de tratamiento (población positiva para el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit/CTA).

El análisis del subconjunto de positivos para el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit/CTA (n = 264) reveló que los pacientes tratados con afatinib habían experimentado un aumento significativo en el tiempo de SSP (mediana de SSP de 11,2 frente a 6,9 meses) y presentaban menos probabilidades de sufrir un evento de progresión de la enfermedad o de muerte (CR = 0,49; IC del 95 % [0,35; 0,69]; p<0,0001) que los pacientes tratados con quimioterapia. La ventaja clínica observada en el subconjunto de pacientes sometidos a análisis con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit era comparable a la observada en la población total del estudio (n = 345).

Datos de resultados clínicos: IRESSA®

El ensayo clínico IFUM (IRESSA Follow-up Measure) era un estudio de fase 4, abierto, de un solo grupo (NCT01203917) para caracterizar la eficacia y la seguridad y tolerabilidad del gefitinib como primera línea de tratamiento en pacientes caucásicos en fase IIIA/B/IV positivos para la mutación de EGFR con NSCLC localmente avanzado o metastásico. El estudio IFUM se ha diseñado para evaluar la tasa de respuesta objetiva mediante criterios RECIST en pacientes caucásicos con NSCLC positivos para la mutación de EGFR seleccionados de forma prospectiva.

Para participar en el estudio, los pacientes debían presentar una delección en el exón 19 de EGFR, una mutación por sustitución L858R, L861Q o G719X y no presentar mutaciones T790M o S768I ni inserciones en el exón 20 en materiales de muestra tumorales determinadas prospectivamente con el CTA. Se llevaron a cabo pruebas retrospectivas de los materiales de muestra de pacientes sometidos al cribado para el ensayo clínico IFUM con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit con fines terapéuticos. Se realizó un estudio puente para determinar la concordancia del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit con el CTA utilizado en la selección de pacientes para el ensayo clínico IFUM. La concordancia global entre los dos ensayos para la detección de las delecciones del exón 19 del EGFR y la mutación L858R fue del 98,2 % (n = 700/713; IC del 95 %: 96,9 %, 99,0 %) con el PCP del 88,2 % (n = 90/102; IC del 95 %: 80,4 %, 93,8 %) con el PCN del 99,8 % (n = 610/611; IC del 95 %: 99,1 %, 100,0 %).

Se obtuvieron resultados de prueba del CTA para 859 pacientes cribados, 106 de los cuales fueron aptos para el tratamiento con gefitinib. De las 859 muestras con un resultado para el CTA, 765 estuvieron disponibles para el análisis retrospectivo mediante el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, incluidas 87 muestras con un resultado positivo para la mutación de EGFR tanto con el CTA como con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

El resultado de eficacia principal fue la tasa de respuesta objetiva (TRO) obtenida según la valoración realizada por un comité de revisión central independiente y ciega (Blinded Independent Central Review, BICR) y por los investigadores. La ventaja clínica observada en el subconjunto de pacientes analizados con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit era comparable con la observada en la población total del estudio.

Los resultados de la eficacia global se resumen en la tabla 14.

Tabla 14. Ventajas clínicas de los pacientes analizados con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit en la población del ensayo clínico IFUM

Parámetro	Población positiva para el <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit, n = 87	Población positiva para CTA n = 106
Tasa de respuesta objetiva (TRO) según BICR		
Número de respuestas (N)	42	53
TRO, % (IC del 95 %)	48,3 (38,1-58,6)	50,0 (40,6-59,4)
Duración media de la respuesta (meses)	6,9 (5,6-11,4)	6,0 (5,6-11,1)
Tasa de respuesta objetiva (TRO) según investigadores		
Número de respuestas (N)	62	74
TRO, % (IC del 95 %)	71,3 (61,0-79,7)	69,8 (60,5-77,7)
Duración media de la respuesta (meses)	8,3 (7,2-11,3)	8,3 (7,6-11,3)

BICR: Blinded independent central review (comité de revisión central independiente y ciega); IC: Intervalo de confianza; CTA: Clinical trial assay (prueba de ensayo clínico).

Nota: "Población positiva" hacer referencia a los resultados positivos para deleciones del exón 19/L8585R/L861Q/G719X.

Dado que no se utilizó el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit para seleccionar a los pacientes del ensayo clínico IFUM, se realizaron análisis de eficacia adicionales para valorar los pacientes que no se habían incluido en el ensayo por obtener resultados negativos con el CTA, pero que podrían haber obtenido resultados positivos con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (es decir, positivo con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit/negativo con el CTA), así como los pacientes que participaron en el ensayo pero que no presentaron resultados válidos en la repetición del análisis del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (es decir, resultado desconocido con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit/positivo con el CTA). Por lo general, los resultados de todos los análisis hipotéticos fueron similares a los de los análisis de eficacia principal.

Referencias

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

Los símbolos siguientes pueden aparecer en el embalaje y las etiquetas:

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material
	Proteger de la luz
	Número mundial de artículo comercial
Rn	“R” es la revisión del Manual de instrucciones de uso y “n” es el número de revisión
	Limitación de temperatura
	Fabricante
	Consultar las instrucciones de uso
	Precaución

Apéndice A: Protocolo manual del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Este apartado contiene instrucciones para utilizar el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit con el software Rotor-Gene Q versión 2.3 en modo abierto (es decir, sin utilizar el software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Información general

- Para obtener una lista de los materiales necesarios, consulte el apartado *Materiales requeridos pero no suministrados*.
- Para obtener instrucciones completas sobre la preparación y la disposición de las muestras, consulte los apartados *Protocolo: Valoración de las muestras* y *Protocolo: detección de mutaciones de EGFR*.
- Asegúrese de que los parámetros de ciclo son correctos antes de iniciar cada serie.

Protocolo: creación de un perfil de temperatura

Antes de empezar, cree un perfil de temperatura para el análisis del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Los parámetros de ciclado son los mismos para la valoración de muestras de ADN y la detección de mutaciones de EGFR.

Procedimiento

En la tabla 15 se resumen los parámetros de ciclado.

Tabla 15. Perfil de temperatura

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Obtención de datos
1	95 °C	15 minutos	Ninguno
40	95 °C	30 segundos	Ninguno
	60 °C	60 segundos	Green y Yellow

1. Haga doble clic en el icono del software Rotor-Gene Q, versión 2.3, situado en el escritorio del PC conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
2. Para crear un nuevo molde, seleccione Empty Run (Serie vacía) y haga clic en New (Nueva) para acceder al "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 fijación esté sujeto y marque la casilla Locking Ring Attached (Anillo de fijación sujeto). Haga clic en Next (Siguiente) (figura 20).

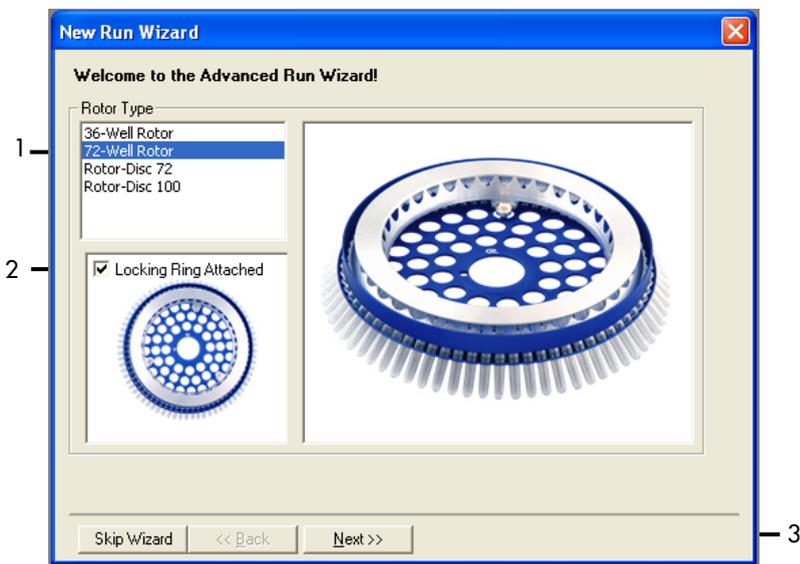


Figura 20. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas). 1 = "Rotor type" (Tipo de rotor); 2 = casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de fijación sujeto); 3 = "Next" (Siguiente).

4. Introduzca el nombre del usuario. Añada las notas que desee e introduzca el volumen de reacción como 25. Asegúrese de que se indica 1, 2, 3... en el campo Sample Layout (Disposición de muestras). Haga clic en Next (Siguiete) (figura 21).

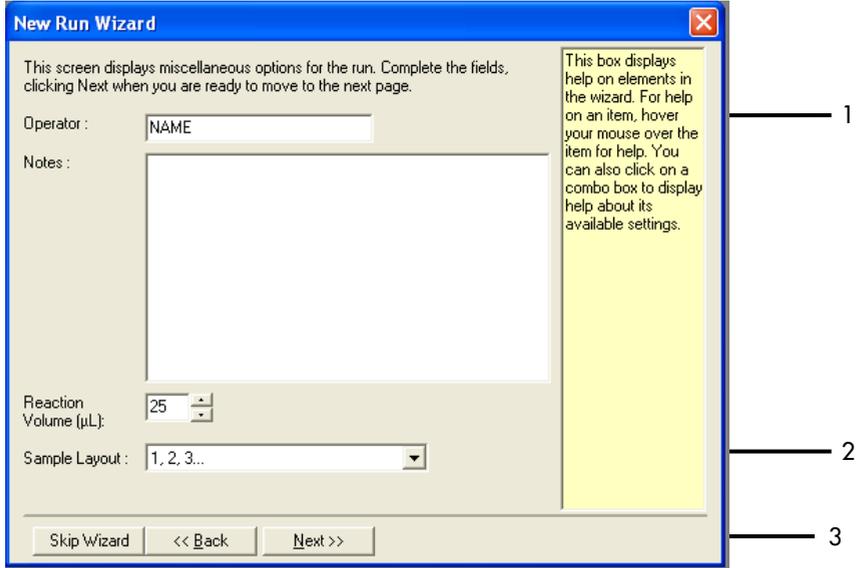


Figura 21. Introducción del nombre del usuario y los volúmenes de reacción. 1 = campo de diálogo “Operator” (Operador) y campo de diálogo “Notes” (Notas); 2 = campo “Reaction Volume” (Volumen de reacción) y campo “Sample Layout” (Disposición de muestras); 3 = “Next” (Siguiete).

5. Haga clic en Edit Profile (Editar perfil) situado en el cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas) (figura 22) y revise los parámetros de la serie analítica según los pasos siguientes.

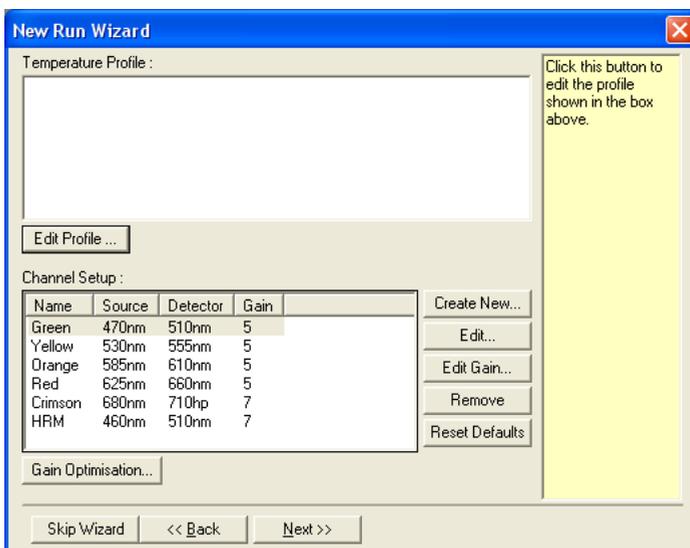


Figura 22. "Edit Profile" (Editar perfil) en el cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas)

6. Haga clic en Insert after (Insertar después) y seleccione New Hold at Temperature (Nueva fase de temperatura) (figura 23).

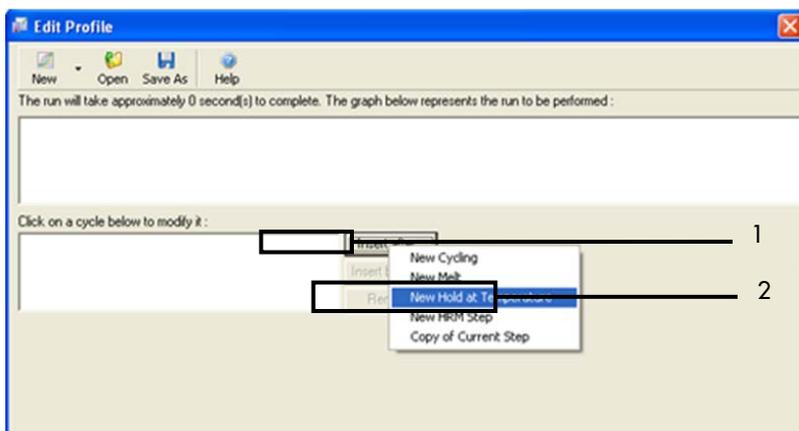


Figura 23. Inserción de un paso de incubación inicial. 1 = "Insert after" (Insertar después); 2 = "New Hold at Temperature" (Nueva fase de temperatura).

7. Establezca el valor del campo Hold Temperature (Temperatura de retención) en 95°C y el valor del 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 24).

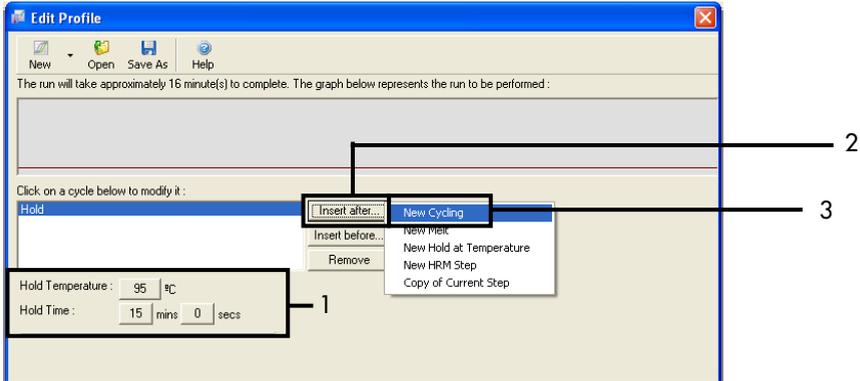


Figura 24. Paso de incubación inicial a 95 °C. 1 = "Hold Temperature" (Mantener temperatura) y "Hold Time" (Tiempo de retención); 2 = "Insert after" (Insertar después); 3 = "New Cycling" (Ciclos nuevos).

8. Establezca el número de repeticiones de ciclo en 40. Seleccione el primer paso y establezca 95°C durante 30 segundos) (figura 25).

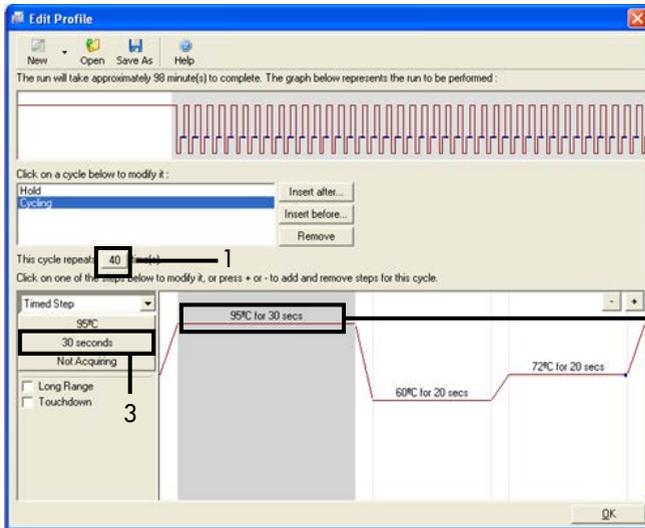


Figura 25. Paso de ciclado a 95 °C. 1 = casilla "Cycle repeats" (Repeticiones de ciclo); 2 = paso uno: ajuste de temperatura; 3 = paso uno: ajuste de tiempo.

9. Seleccione el segundo paso y establezca 60°C durante 60 segundos. Haga clic en Not Acquiring (No adquirir) para activar la adquisición de datos durante este paso. Figura 26

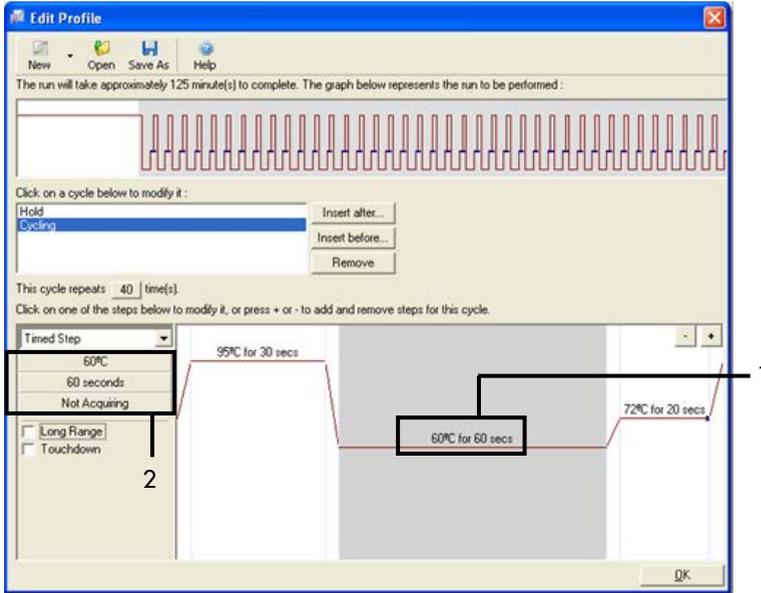


Figura 26. Paso de ciclado a 60 °C. 1 = paso dos: ajuste de temperatura y tiempo; 2 = "Not Acquiring" (No adquirir).

10. Seleccione Green y Yellow como canales de adquisición. Haga clic en > para transferir estos canales de la lista "Available Channels" (Canales disponibles) a la sección Acquiring Channels (Canales de adquisición). Haga clic en OK (Aceptar) (figura 27).

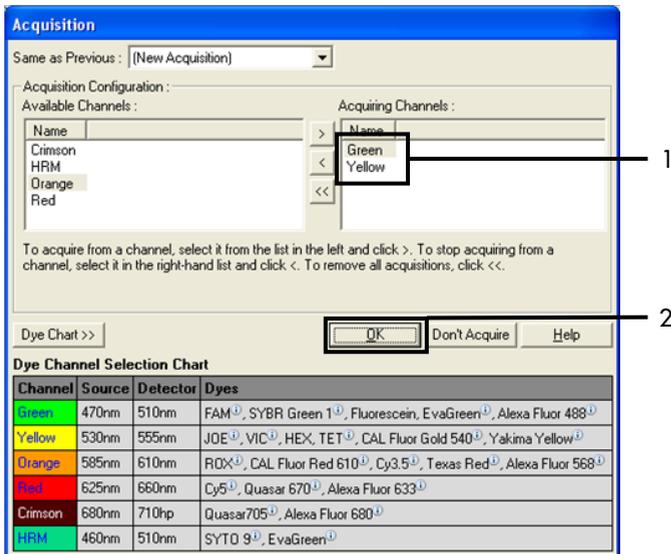


Figura 27. Adquisición en el paso de ciclado a 60 °C. 1 = canales seleccionados; 2 = "OK" (Aceptar).

11. Seleccione el tercer paso y haga clic en - para eliminarlo. Haga clic en OK (Aceptar) (figura 28).

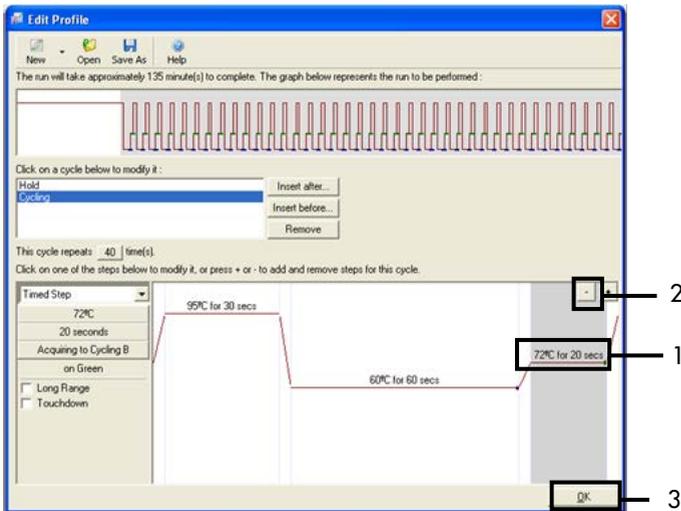


Figura 28. Eliminación del paso de extensión 1 = tercer paso; 2 = eliminar; 3 = "OK"(Aceptar).

12. En el cuadro de diálogo siguiente, haga clic en Gain Optimisation (Optimización de la ganancia) (figura 29).

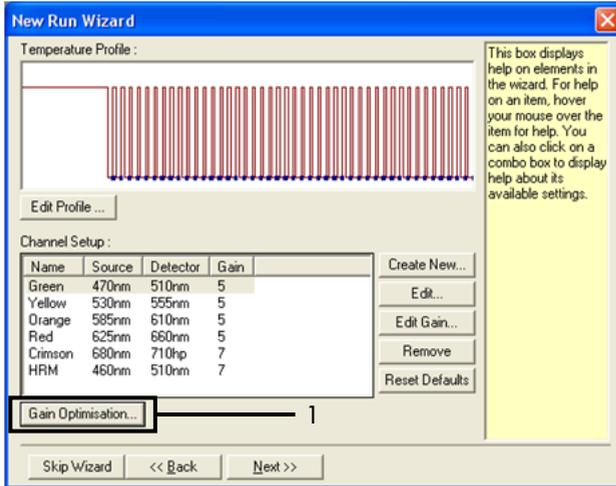


Figura 29. Gain optimisation (Optimización de la ganancia) (1).



13. Haga clic en Optimise Acquiring (Optimizar adquisición). Para cada canal, se muestra la configuración de canal. Haga clic en OK (Aceptar) para aceptar estos valores predeterminados para ambos canales. (Figura 30).

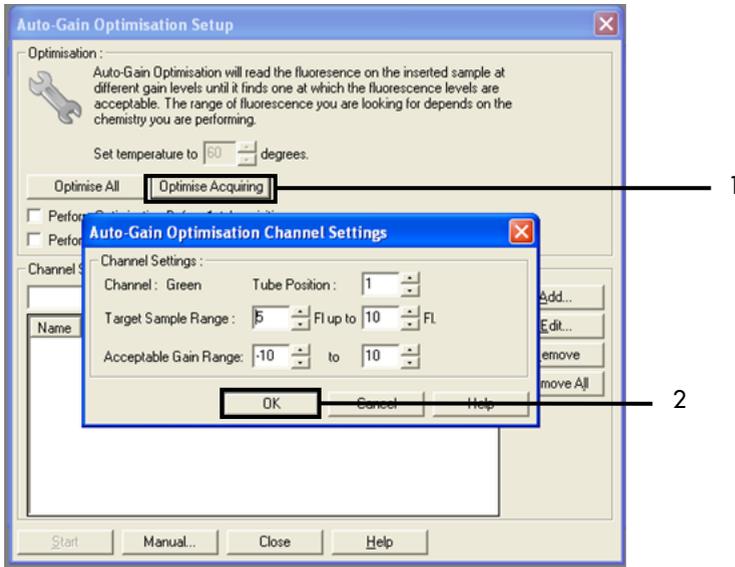


Figura 30. Optimización de la ganancia automática para el canal Green. 1 = "Optimise Acquiring" (Optimizar adquisición); 2 = "OK" (Aceptar).

14. Active 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 31).

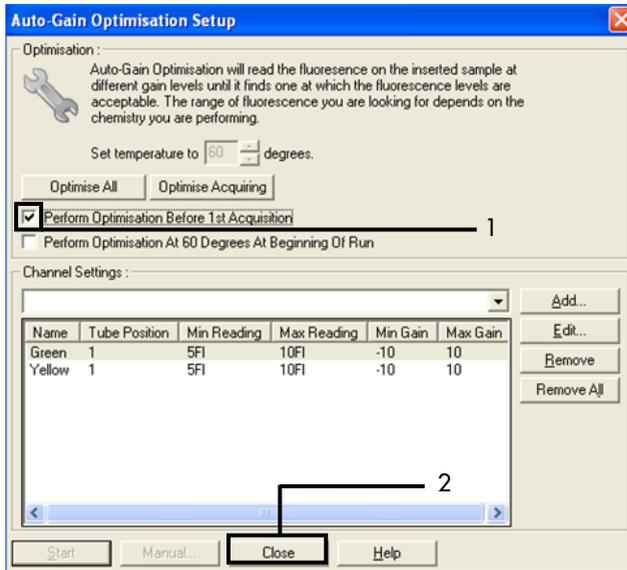


Figura 31. Selección de los canales Green y Yellow. 1 = casilla de verificación "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Ejecutar la optimización antes de la 1.ª adquisición), 2 = "Close" (Cerrar).

15. Haga clic en Next (Siguiete) (figura 32). Haga clic en Save Template (Guardar molde) para guardar la plantilla del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (archivo *.ret) en una ubicación adecuada.

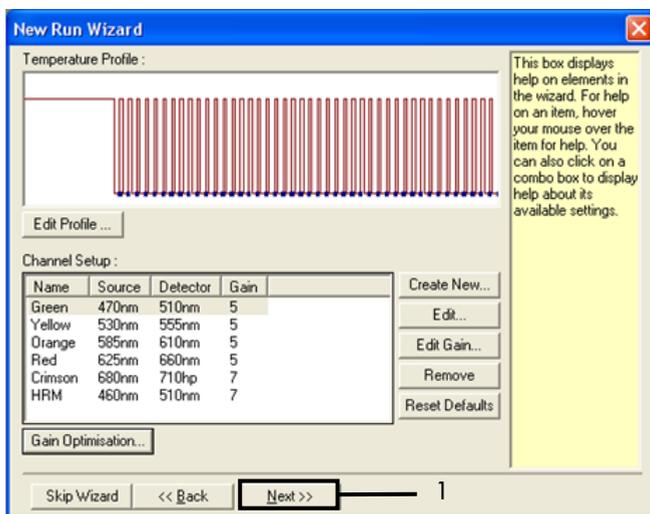


Figura 32. "Next" (Siguiente) (1).

Procedimiento (manual)

Protocolo: valoración de las muestras (manual)

Este protocolo se utiliza para valorar el ADN total amplificable de las muestras y debería aplicarse antes de realizar el análisis de mutación de EGFR.

- Prepare las muestras como se describe en el apartado Protocolo: Valoración de las muestras, hasta el paso 11.
- Configure la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tal como se describe en el apartado Protocolo: *configuración* del theascreen EGFR RGQ PCR Kit con el software Rotor-Gene Q.
- Una vez finalizada la serie, analice los datos según las instrucciones del apartado Análisis de los datos de valoración de las muestras.

Protocolo: detección de mutaciones de EGFR (manual)

- Cuando una muestra es correcta según la evaluación de muestras, se puede analizar para detectar mutaciones de EGFR.
- Prepare las muestras tal como se describe en el apartado Protocolo: detección de mutaciones de EGFR, hasta el paso 11.
- Configure la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tal como se describe en el apartado Protocolo: *configuración* del theascreen EGFR RGQ PCR Kit con el software Rotor-Gene Q.
- Una vez finalizada la serie, analice los datos según las instrucciones del apartado Análisis de los datos de la detección de mutaciones del gen EGFR.

Protocolo: configuración del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit con el software Rotor-Gene Q

Procedimiento

1. Abra el software Rotor-Gene Q versión 2.3 y el perfil de temperatura adecuado del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (archivo *.ret).

Para obtener instrucciones sobre la creación del perfil de temperatura y la comprobación de los parámetros de la serie analítica, consulte Protocolo: creación de un perfil de temperatura.

2. Asegúrese de seleccionar el rotor correcto y marque la casilla Locking Ring Attached (Anillo de fijación sujeto). Haga clic en Next (Siguiente) (figura 33).

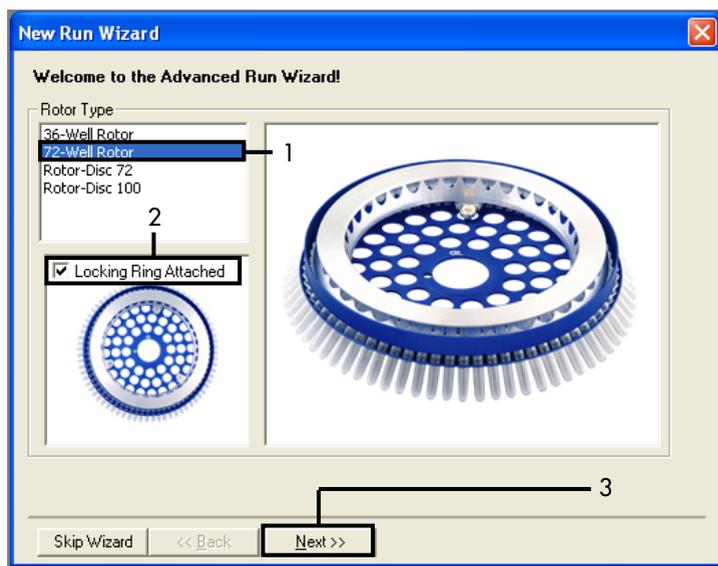


Figura 33. Cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas) y pantalla de inicio. 1 = “Rotor type” (Tipo de rotor); 2 = casilla “Locking Ring Attached” (Anillo de fijación sujeto); 3 = “Next” (Siguiente).

3. Introduzca el nombre del usuario. Añada las notas que desee y compruebe que el volumen de reacción esté establecido en 25 y que el campo Sample Layout (Disposición de muestras) contenga el valor 1, 2, 3.... Haga clic en Next (Siguiete) (figura 34).

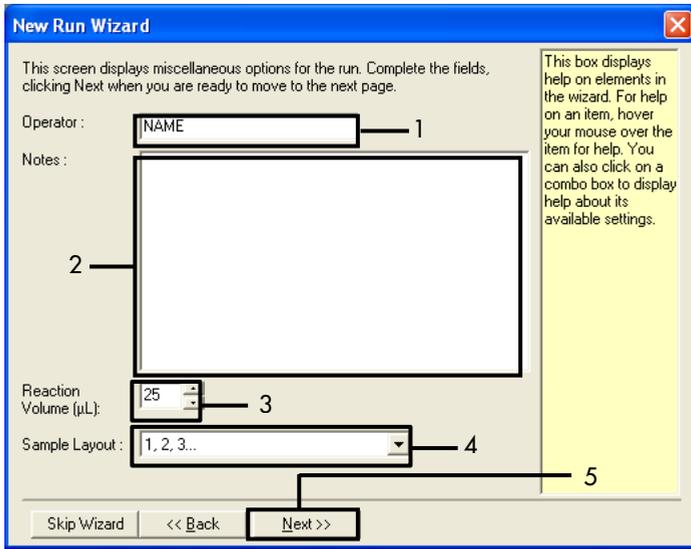


Figura 34. Pantalla de opciones “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas) 1 = “Operator” (Operador); 2 = campo “Notes” (Notas); 3 = “Reaction Volume” (Volumen de reacción); 4 = campo “Sample Layout” (Disposición de muestras); 5 = “Next” (Siguiete).

Nota: La siguiente ventana permite editar el perfil de temperatura. (No es necesario editar, porque el perfil de temperatura se ha creado según las instrucciones del apartado Protocolo: creación de un perfil de temperatura)

4. Haga clic en Next (Siguiete) (figura 35).

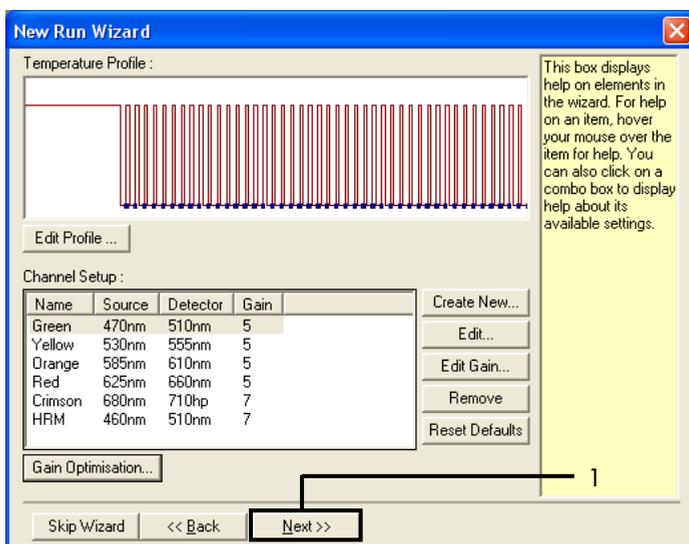


Figura 35. Cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas) y pantalla de edición de temperatura (1 = “Next” [Siguiente])

5. Compruebe el resumen y haga clic en Start Run (Iniciar la serie) para guardar el archivo de ejecución y comenzar la serie (figura 36).

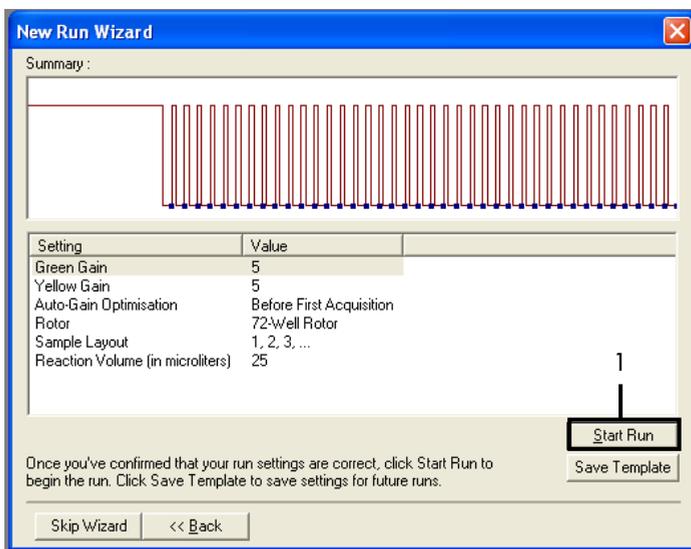


Figura 36. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) y pantalla de resumen (1 = "Start Run" [Iniciar la serie])

6. Siga uno de los siguientes pasos en la nueva ventana que aparece tras iniciarse la serie:

- Introduzca los nombres de las muestras.
- Haga clic en Finish (Finalizar) e introduzca después los nombres de las muestras.

Para ello, seleccione Sample (Muestra) durante la serie o tras finalizar la serie.

Importante: Si hace clic en Finish and Lock Samples (Finalizar y bloquear muestras), ya no podrá editar los nombres de las muestras. Debe extremar la precaución al introducir los nombres de las muestras para asegurarse de realizar correctamente las pruebas y los análisis de las muestras.

Nota: al introducir el nombre de las muestras, los campos para tubos vacíos deben dejarse en blanco en la columna "Name" (Nombre).

- Una vez finalizada la serie, analice los datos según lo establecido en los apartados Análisis de los datos de valoración de las muestras o Análisis de los datos de la detección de mutaciones del gen EGFR, según corresponda.
- Si necesita crear informes de cuantificación, haga clic en el icono Reports (Informes) situado en la barra de herramientas del archivo de ejecución de Rotor-Gene Q.

9. En el explorador de informes, haga clic en Cycling A Green (Page 1) (Cycling A Green [Página 1]) en "Report Categories" (Categorías de informes) (figura 37).

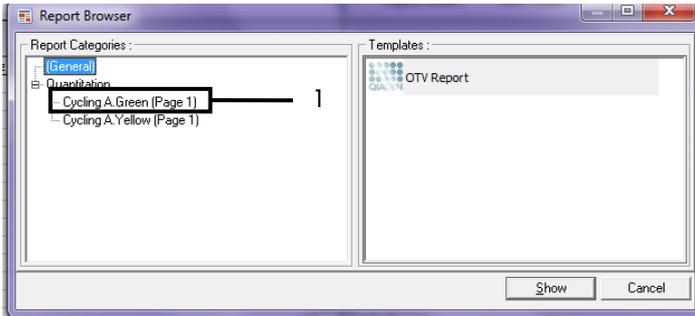


Figura 37. Explorador de informes (1 = "Cycling A. Green [Page 1]" (Cycling A. Green [Página 1])).

10. Seleccione Quantitation (Full Report) (Cuantificación [Informe completo]) en “Templates” (Moldes) (figura 38).

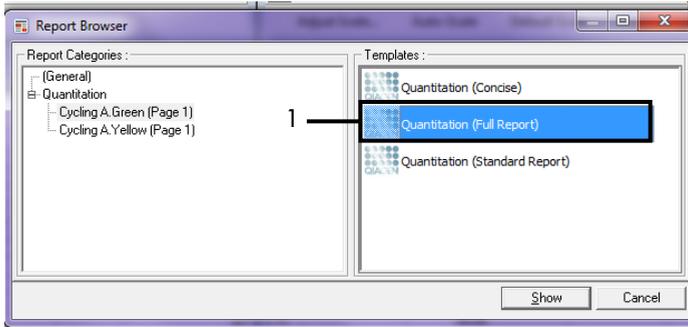


Figura 38. Informe de cuantificación (informe completo) (1).

11. Para generar el informe, haga clic en Show (Mostrar).
12. Haga clic en Save As (Guardar como) para guardar una versión electrónica.
13. Repita el procedimiento para Cycling A Yellow (Page 1) (Cycling A Yellow [Página 1]).

Interpretación de los resultados (manual)

Una vez finalizada la serie del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (para la valoración de muestras de ADN o el análisis de mutaciones de EGFR), analice los datos conforme a los procedimientos que se indican a continuación:

- Configuración del software para el análisis
- Análisis para la valoración de muestras de ADN (manual)
Nota: Consulte la tabla 4 para conocer el esquema de tubos.
- Análisis para la detección de mutaciones de EGFR (manual)
Nota: Consulte la tabla 7 para conocer el esquema de tubos.

Configuración del análisis del software

1. Utilice el software Rotor-Gene Q versión 2.3 para abrir el archivo de serie analítica (*.rex) adecuado.
2. Si no se ha introducido 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 tubos vacíos.
4. Haga clic en Analysis (Análisis). En la página de análisis, haga clic en Cycling A Yellow para comprobar el canal Yellow (HEX).
5. Haga clic en Named On (Con nombre).
Nota: esto permite asegurarse de que los tubos vacíos no se incluyan en el análisis.
6. Seleccione Dynamic tube (Tubo dinámico).
7. Seleccione Slope correct (Pendiente correcta).
8. Seleccione Linear scale (Escala lineal).

-
9. Seleccione Take Off Adj (Ajuste de inicio) e introduzca los valores 15.01 en la casilla superior ("If take off point was calculated before cycle" [Si el punto de inicio se calculó antes que el ciclo]) y 20.01 en la casilla inferior ("then use the following cycle and take off point" [utilice el ciclo y el punto de inicio siguientes]).
 10. Configure el umbral en 0.02 y compruebe los valores de C_T del canal Yellow (HEX).
 11. En la página de análisis, haga clic en Cycling A Green para ver el canal Green (FAM).
 12. Seleccione Named On (Con nombre).
 13. Seleccione Dynamic tube (Tubo dinámico).
 14. Seleccione Slope correct (Pendiente correcta).
 15. Seleccione Linear scale (Escala lineal).
 16. Seleccione Take Off Adj (Ajuste de inicio) e introduzca los valores 15.01 en la casilla superior ("If take off point was calculated before cycle" [Si el punto de inicio se calculó antes que el ciclo]) y 20.01 en la casilla inferior ("then use the following cycle and take off point" [utilice el ciclo y el punto de inicio siguientes]).
 17. Configure el umbral en 0.075 y compruebe los valores de C_T del canal Green (FAM).

Análisis de los datos de valoración de las muestras

Una vez finalizada la serie de valoración de muestras de ADN, consulte el apartado Configuración del análisis del software y analice los datos tal como se indica a continuación. (Consulte la tabla 4, en la página 28, para conocer el esquema de tubos).

Análisis de control de la serie

Control negativo

Para garantizar que el molde no está contaminado, el NTC no debe generar un valor de C_T inferior a 40 en el canal Green (FAM).

Para garantizar que la serie está configurada correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación dentro del intervalo de 29,85 a 35,84 en el canal Yellow (HEX). Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos).

Control positivo

El control positivo (Positive Control, PC) de EGFR debe generar un valor de C_T en el canal Green (FAM) dentro del intervalo de 28,13 a 34,59. La aparición de un valor fuera de este intervalo indica un problema de configuración del ensayo. La serie ha generado un error.

Nota: no deben utilizarse los datos de las muestras si ha fallado el control negativo o positivo.

Análisis de la muestra

Si los controles de la serie de valoración de muestras de ADN son válidos, se puede continuar con el análisis. El valor de C_T de control de una muestra debe encontrarse dentro del intervalo 23,70-31,10 del canal Green (FAM). Si el valor de C_T de la muestra se encuentra fuera de este intervalo, proceda como se indica a continuación para cada caso.

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra $<23,70$

Las muestras con un valor de C_T de control $<23,70$ (concentración elevada de ADN) sobrecargarán los ensayos de mutación, por lo que deben diluirse. Para detectar cada mutación a un nivel bajo, se diluyen las muestras sobreconcentradas para que queden comprendidas en el intervalo de C_T de $23,70$ a $31,10$. Al diluir el ADN de la muestra, aumenta el C_T (una dilución 1:1 aumenta el valor de C_T en aproximadamente 1,0). Diluya las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para dilución [Dil.]).

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra $>31,10$

Se recomienda volver a extraer las muestras con un C_T de control $>31,10$ en el canal Green (FAM). El ADN molde inicial presente no es suficiente para detectar todas las mutaciones de EGFR con los valores de corte indicados para el ensayo.

Análisis de los datos de la detección de mutaciones del gen EGFR

Una muestra debe ser correcta según la valoración de muestras de ADN para poder analizarla y detectar mutaciones de EGFR (consulte Análisis de los datos de valoración de las muestras).

Una vez finalizada la serie de detección de mutaciones de EGFR, consulte el apartado Configuración del análisis del software y analice los datos tal como se indica a continuación. (Consulte la tabla 7 para conocer el esquema de tubos).

Análisis de control de la serie

Consulte el organigrama del análisis de control de la serie en la figura 39.

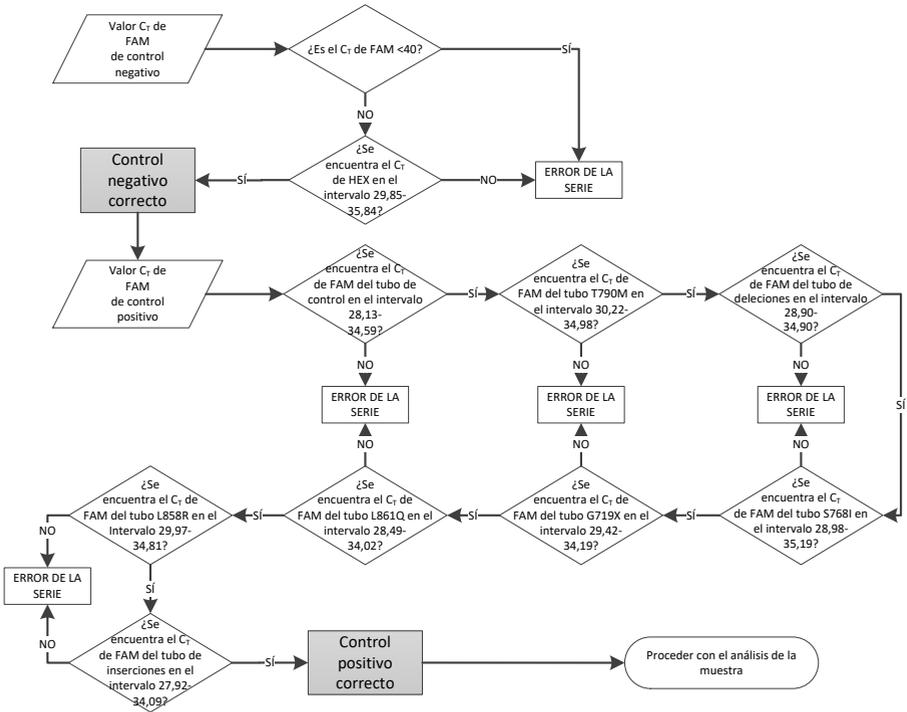


Figura 39. Organigrama del análisis de control de la detección de mutaciones de EGFR

Control negativo

Para garantizar que el molde no está contaminado, el NTC de cada ensayo de mutación de EGFR no debe generar un valor de C_T inferior a 40 en el canal Green (FAM).

Para garantizar que la serie está configurada correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación dentro del intervalo de 29,85 a 35,84 en el canal Yellow (HEX). Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos).

Control positivo

En cada ensayo de mutación de EGFR, el control positivo (Positive Control, PC) de EGFR debe generar un valor de C_T en el canal Green (FAM) dentro del intervalo como se indica en la tabla 16. La aparición de un valor fuera de este intervalo indica un problema de configuración del ensayo. La serie ha generado un error.

Nota: no deben utilizarse los datos de las muestras si el control de análisis negativo o positivo da error.

Tabla 16. Intervalos de C_T aceptables para los controles positivos de reacción (ensayo de detección de mutaciones de EGFR)

Mezcla de reacción	Muestra	Canal	Intervalo de C_T
Control	PC	Green	28,13-34,59
T790M	PC	Green	30,22-34,98
Deleciones	PC	Green	28,90-34,90
L858R	PC	Green	29,97-34,81
L861Q	PC	Green	28,49-34,02
G719X	PC	Green	29,42-34,19
S768I	PC	Green	28,98-35,19
Inserciones	PC	Green	27,92-34,09

Análisis de la muestra: valor de C_T del canal Green (FAM) para el control de la muestra

Si los controles positivo y negativo de la serie de detección de mutaciones de EGFR son válidos, se puede continuar con la detección de mutaciones de EGFR en las muestras.

El valor de C_T de control para una muestra en el canal Green (FAM) debe figurar en el intervalo de 23,70 a 31,10. (Consulte la tabla 7 para conocer el esquema de tubos).

Si el valor de C_T de control para la muestra se encuentra fuera de este intervalo, proceda como se indica a continuación para cada caso.

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra $<23,70$

Las muestras con un valor de C_T de control $<23,70$ (concentración elevada de ADN) sobrecargarán los ensayos de mutación, por lo que deben diluirse. Para detectar cada mutación a un nivel bajo, se diluyen las muestras sobreconcentradas para que queden comprendidas en el intervalo de C_T de 23,70 a 31,10. Al diluir el ADN de la muestra, aumenta el C_T (una dilución 1:1 aumenta el valor de C_T en aproximadamente 1,0). Diluya las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para dilución [Dil.]).

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra $>31,10$

Se recomienda volver a extraer las muestras con un C_T de control $>31,10$ en el canal Green (FAM). El ADN molde inicial presente no es suficiente para detectar todas las mutaciones de EGFR con los valores de corte indicados para el ensayo.

Consulte el organigrama del análisis de la muestra para la detección de mutaciones de EGFR en la figura 40.

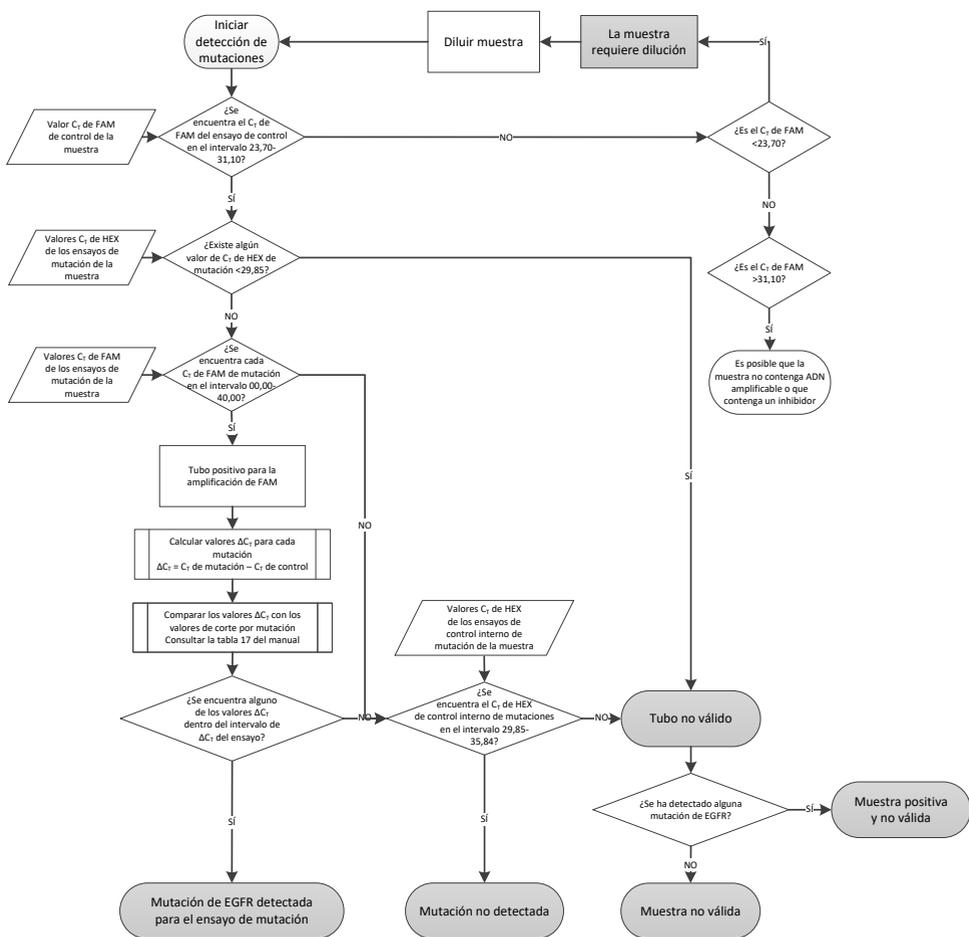


Figura 40. Organigrama del análisis de la muestra para la detección de mutaciones de EGFR.

Análisis de la muestra: valor de C_T del canal Yellow (HEX) del control interno de la muestra

Nota: Consulte el organigrama del análisis de la muestra para la detección de mutaciones de EGFR en la figura 40.

Es necesario analizar todos los tubos de cada muestra. Compruebe que cada tubo genere una señal HEX comprendida en el intervalo de 29,85 a 35,84 del control interno en el canal Yellow (HEX). Existen 3 resultados posibles.

- Si el C_T del control interno está por debajo del intervalo especificado ($<29,85$) para un ensayo de mutación, el resultado para la amplificación de canal Yellow (HEX) no será válido. La amplificación de canal Yellow (HEX) de ese tubo no es válida.
- Si el C_T del control interno se incluye dentro del intervalo especificado (de 29,85 a 35,84), el resultado es positivo para la amplificación de canal Yellow (HEX). La amplificación de canal Yellow (HEX) del tubo es válida.
- Si el C_T del control interno está por encima del intervalo especificado ($>35,84$), el resultado es negativo para la amplificación de canal Yellow (HEX).

Si existe amplificación en el canal Green (FAM) y el valor de ΔC_T de la reacción es menor o igual que el valor de corte del ensayo para dicho tubo, la amplificación de canal Yellow (HEX) es válida. Si no existe amplificación en el canal Green (FAM) para el tubo o el valor de ΔC_T es superior al valor de corte del ensayo, la amplificación de canal Yellow (HEX) no es válida.

La amplificación del control interno en el canal Yellow (HEX) puede generar un error provocado por una inhibición de la PCR. Si se diluye la muestra, se pueden reducir los efectos de los inhibidores. Cabe destacar que esta acción también diluye el ADN diana de la muestra. Diluya las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para dilución [Dil.]).

Análisis de la muestra: valor de C_T del canal Green (FAM) de los ensayos de mutaciones de la muestra

Es necesario comparar los valores del canal Green (FAM) de las siete mezclas para reacción de mutación de EGFR con los valores de la tabla 17. Los valores especificados son los comprendidos entre los valores mostrados (que también se incluyen). (Consulte la tabla 7 para conocer el esquema de tubos).

Tabla 17. Valores aceptables para las reacciones de mutaciones de EGFR de las muestras en el canal Green (FAM) (ensayo de detección de mutaciones de EGFR)

Ensayo	Intervalo de C_T	Valor de corte (ΔC_T)
T790M	0,00-40,00	$\leq 7,40$
Deleciones	0,00-40,00	$\leq 8,00$
L858R	0,00-40,00	$\leq 8,90$
L861Q	0,00-40,00	$\leq 8,90$
G719X	0,00-40,00	$\leq 8,90$
S768I	0,00-40,00	$\leq 8,90$
Inserciones	0,00-40,00	$\leq 8,00$

- Si el C_T del canal Green (FAM) de la muestra se incluye dentro del intervalo especificado, la amplificación de FAM es positiva.
- Si el C_T del canal Green (FAM) de la muestra está por encima del intervalo especificado o si no existe amplificación, la amplificación de FAM es negativa.

Calcule el valor de ΔC_T de todos los tubos de detección de mutaciones de EGFR que presenten amplificación de FAM positiva tal y como se indica a continuación. Es importante utilizar los valores de C_T de mutación y de control de una misma muestra. (Consulte la tabla 7 para conocer el esquema de tubos).

$$\Delta C_T = [\text{valor de } C_T \text{ del ensayo de mutación}] - [\text{valor de } C_T \text{ del ensayo de control}]$$

Compare el valor de ΔC_T de la muestra con el punto de corte del ensayo en cuestión (tabla 17). Asegúrese de que se aplica el punto de corte correcto.

El punto de corte es el punto a partir del que una señal positiva de un ensayo podría ser la respuesta a una señal de fondo del primer ARMS en ADN nativo. Si el valor de ΔC_T de la

muestra es superior al punto de corte de un ensayo, la muestra se considera negativa o fuera de los límites de detección del kit de dicho ensayo.

El estado de las reacciones de mutación de cada muestra puede ser uno de los siguientes:

- Mutación detectada
- Mutación no detectada
- No válido

Mutación detectada

La amplificación del canal Green (FAM) es positiva y el valor de ΔC_T es igual, o inferior, al valor de corte. Si se detectan varias mutaciones para una muestra, pueden notificarse todas.

Mutación no detectada

La amplificación del canal Green (FAM) es positiva y el valor de ΔC_T está por encima del valor de corte.

La amplificación del canal Green (FAM) es negativa y la amplificación del canal Yellow (HEX) (control interno) es positiva.

No válido

La amplificación del canal Yellow (HEX) (control interno) no es válida.

La amplificación del canal Green (FAM) es negativa y la amplificación del canal Yellow (HEX) (control interno) es negativa.

Nota: una muestra puede ser negativa para la amplificación del canal Yellow (HEX) en un tubo, pero positiva para la amplificación del canal Green (FAM) en un segundo tubo. En este caso, un resultado "Mutation detected" (Mutación detectada) en un segundo tubo se puede considerar válido, si bien la mutación específica identificada puede no ser la única presente en la muestra.

Apéndice B: instalación del software *therascreen* EGFR CE Assay Package

El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit se ha diseñado para su uso con el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM y con un rotor de 72 pocillos. El software *therascreen* EGFR CE Assay Package se encuentra disponible por separado en CD (referencia 9023537). El paquete de ensayo incluye “*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template” y “*therascreen* EGFR CE Locked Template”.

Nota: El software *therascreen* EGFR CE Assay Package solamente es compatible con el software Rotor-Gene Q, versión 2.3. Compruebe que se haya instalado la versión correcta del software Rotor-Gene Q antes de proceder a instalar *therascreen* EGFR CE Assay Package. Si utiliza un equipo Rotor-Gene Q MDx con una versión de software anterior, actualícela descargándose la versión 2.3 del software Rotor-Gene Q de la página de producto de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, en el apartado “Product Resources” (Recursos de producto), en “Operating Software” (Software operativo); consulte www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources.

Procedimiento

1. Solicite el CD *therascreen* EGFR CE Assay Package (referencia 9023537).
2. Introduzca el CD en la unidad correspondiente del ordenador conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
3. Si el CD se carga automáticamente, haga doble clic en el archivo `therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe` para iniciar la instalación.

También puede localizar e iniciar este archivo ejecutable mediante el explorador de archivos del ordenador conectado.

Se abre el asistente para la configuración de *therascreen* EGFR CE Assay Package.

4. Haga clic en Next (Siguiente) para continuar (figura 41).

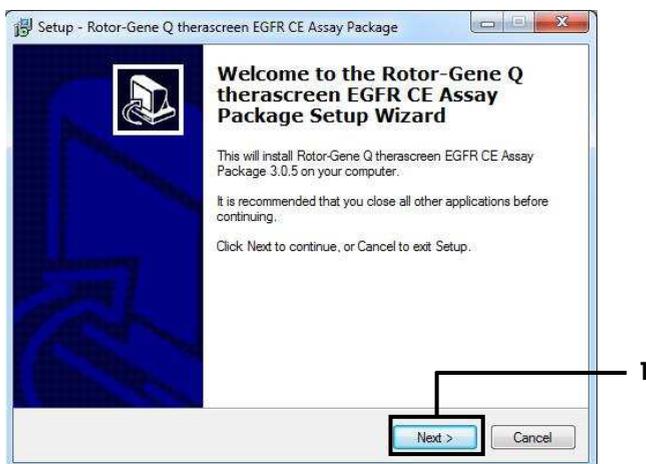


Figura 41. Cuadro de diálogo "Setup Wizard" (Asistente para la configuración) (1 = "Next" [Siguiente]).

5. Lea el Acuerdo de licencia del cuadro de diálogo y marque la casilla I accept the agreement (Acepto el acuerdo). Haga clic en Next (Siguiente) para continuar (figura 42).

La configuración se inicia automáticamente.

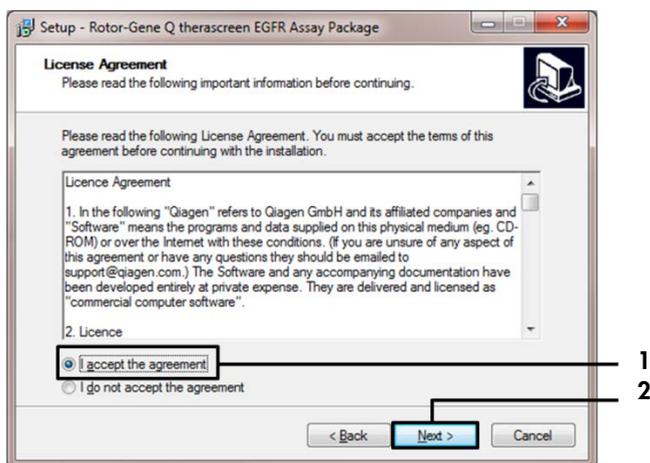


Figura 42. Cuadro de diálogo "License Agreement" (Acuerdo de licencia). 1 = "I accept the agreement" (Acepto el acuerdo); 2 = "Next" (Siguiente).

6. Una vez finalizada la instalación, haga clic en Finish (Finalizar) en el último cuadro de diálogo de Setup Wizard (Asistente para la configuración) (figura 43).

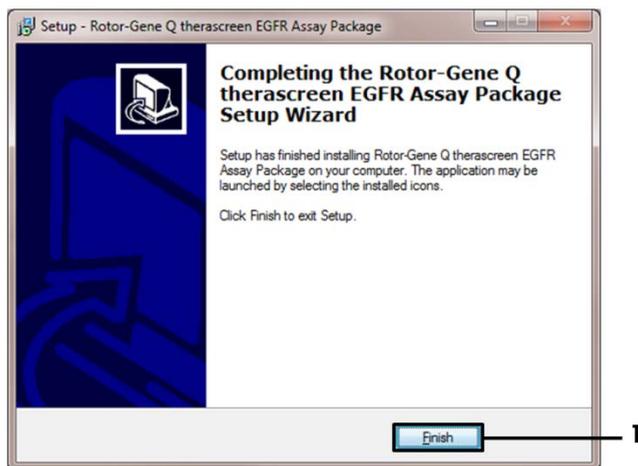


Figura 43. Finalización del asistente para la configuración (1 = "Finish" [Finalizar]).

7. Reinicie el ordenador.

Se generan automáticamente accesos directos a los moldes "thetascreen EGFR CE Control Run Locked Template" (Molde bloqueado para series de control de EGFR CE) y "thetascreen EGFR CE Locked Template" (Molde bloqueado de EGFR CE) y se colocan en el escritorio (figura 44).

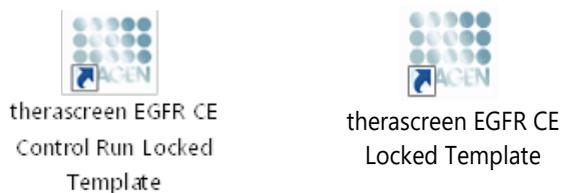


Figura 44. Iconos EGFR CE Control Run Locked Template (Molde bloqueado para series de control de EGFR CE) y EGFR CE Locked Template (Molde bloqueado de EGFR CE).

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).

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de catálogo
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: Ensayo de control, 7 ensayos de mutación, control positivo, Taq ADN polimerasa, agua para control sin molde (NTC) y agua para la dilución de la muestra	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD	Paquete de software de protocolos para el <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit y los equipos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM de QIAGEN	9023537
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: columnas QIAamp MinElute®, proteinasa K, tampones y Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparaciones: 50 columnas QIAamp MinElute, proteinasa K, tampones y Collection Tubes (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para realtime 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, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033

Producto	Contenido	N.º de catálogo
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para realtime 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 y accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra; no se incluye la instalación y la formación	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml 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, 0.1ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapones para 1000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapones para 10 000 reacciones	981106

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

Historial de revisiones del documento

Fecha	Cambios
R4, marzo 2018	<p>Se han modificado los tiempos de almacenamiento de la configuración para aclarar el tiempo de descongelación y el tiempo total en "Condiciones de almacenamiento" y en las tablas 2 y 5.</p> <p>Se ha actualizado la figura 40. Organigrama del análisis de la muestra para la detección de mutaciones de EGFR.</p> <p>Se ha añadido la información para pedidos del QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (n.º de cat. 60404)</p>
R5, enero 2019	<p>Se ha añadido Representante autorizado (cubierta frontal).</p> <p>Se ha actualizado el apartado "Símbolos".</p>
R6, octubre 2019	<p>Se ha cambiado el fabricante legal (página de portada)</p> <p>Se ha adaptado el nombre del equipo, de Rotor-Gene Q MDx a Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM para que coincida con el nombre que aparece en la etiqueta del equipo</p> <p>Se ha añadido una condición de almacenamiento de reactivos en el apartado "Manipulación y almacenamiento de reactivos".</p> <p>Se ha actualizado la tabla 1 para añadir una nota acerca de la retirada de COSM6254 de la base de datos COSMIC</p> <p>Se ha actualizado el apartado Limitaciones con información acerca del ensayo de deleciones del exón 19 y el ensayo de L858R</p> <p>Se ha eliminado el símbolo EC + REP de la página de cubierta y de la sección Símbolos</p>

Acuerdo de licencia limitada para el *therascreen* EGFR 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 debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos 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 y/o 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 o con sus componentes.

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

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

El *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit es un kit de diagnóstico con el marcado CE, conforme a la Directiva Europea 98/79/CE para diagnóstico *in vitro*. No disponible en todos los países.

1119191 10/2019 HB-1909-006 © 2019 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

