

Septiembre de 2019

# Manual de instrucciones de uso del *therascreen*<sup>®</sup> PIK3CA RGQ PCR Kit



Versión 1

**IVD**

Para uso diagnóstico in vitro

Para uso con equipos Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM

Para uso con el QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue Kit

Para uso con el QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating Nucleic Acid Kit



**REF**

873111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
Alemania

R2 **MAT**

1116336ES

Sample to Insight



# Contenido

Uso previsto .....	5
Limitaciones del procedimiento.....	6
Resumen y explicación de la prueba.....	9
Principio del procedimiento .....	11
Mezclas para reacción de mutación .....	11
Plataforma y software.....	16
Materiales suministrados .....	17
Contenido del kit.....	17
Materiales requeridos pero no suministrados .....	18
Advertencias y precauciones.....	20
Precauciones generales.....	21
Almacenamiento y manipulación de los reactivos .....	23
Condiciones de envío .....	23
Condiciones de almacenamiento.....	23
Estabilidad .....	23
Manipulación y almacenamiento del material de muestra.....	25
Almacenamiento de las muestras.....	28
Procedimiento .....	29
Extracción de ADN de material de muestra FFPE .....	29
Extracción de ADN de material de muestra de plasma .....	30
Detección de las mutaciones de <i>PIK3CA</i> .....	31
Realizar una serie analítica de mutación de <i>PIK3CA</i> .....	38

---

Resultados .....	52
Análisis .....	52
Marcadores del perfil de ensayo <i>therascreen</i> PIK3CA en Rotor-Gene AssayManager v2.1 .....	54
Características del rendimiento: Material de muestra de tejido.....	58
Rendimiento analítico: Material de muestra de tejido.....	58
Límite de blanco (LoB): Material de muestra de tejido .....	58
Límite de detección (LoD): Material de muestra de tejido.....	59
Intervalo de entrada de ADN genómico: Material de muestra de tejido.....	60
Valores de corte de $\Delta C_T$ : Material de muestra de tejido .....	61
Efecto del ADN introducido sobre los valores de $\Delta C_T$ (linealidad): Material de muestra de tejido.....	62
Especificidad del ensayo (reactividad cruzada/especificidad): Material de muestra de tejido.....	63
Interferencia: Material de muestra de tejido.....	64
Intercambiabilidad de lotes: Material de muestra de tejido.....	66
Manipulación del material de muestra: Material de muestra de tejido .....	66
Repetibilidad y reproducibilidad: Material de muestra de tejido .....	67
Contaminación cruzada/contaminación por arrastre analítica: Material de muestra de tejido.....	70
Exactitud: Comparación con el método de referencia analítico (material de muestra de tejido).....	71
Rendimiento clínico: Material de muestra de tejido.....	73
Características del rendimiento: Material de muestra de plasma .....	78
Rendimiento analítico: Material de muestra de plasma .....	78

---

Límite de blanco (LoB): Material de muestra de plasma .....	78
Límite de detección (LoD): Material de muestra de plasma.....	79
Intervalo de entrada de ADN genómico: Material de muestra de plasma.....	80
Valores de corte de $\Delta C_T$ : Material de muestra de plasma.....	81
Efecto del ADN introducido sobre los valores de $\Delta C_T$ (linealidad): Material de muestra de plasma .....	82
Especificidad del ensayo (reactividad cruzada/especificidad): Material de muestra de plasma .....	82
Interferencia: Material de muestra de plasma .....	83
Intercambiabilidad de lotes: Material de muestra de plasma .....	84
Manipulación del material de muestra: Material de muestra de plasma .....	84
Repetibilidad y reproducibilidad: Material de muestra de plasma .....	84
Validación de tubos de recogida de sangre .....	88
Exactitud: Comparación con el método de referencia analítico (material de muestra de plasma) .....	89
Rendimiento clínico: Material de muestra de plasma .....	90
Guía de resolución de problemas.....	96
Referencias .....	99
Información de contacto .....	99
Símbolos .....	100
Información para pedidos .....	102
Historial de revisiones del documento .....	105

# Uso previsto

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit es una prueba cualitativa de PCR en tiempo real para la detección de 11 mutaciones en el gen subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol 3-quinasa (*PIK3CA*) (exón 7: C420R; exón 9: E542K, E545A, E545D [1635G>T solamente], E545G, E545K, Q546E, Q546R y exón 20: H1047L, H1047R, H1047Y) utilizando ADN genómico (ADNg) extraído de tejido tumoral mamario incluido en parafina y fijado en formol (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) o ADN tumoral circulante (ADNtc) de plasma derivado de sangre total periférica anticoagulada con EDTA K<sub>2</sub> obtenida de pacientes con cáncer de mama.

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit está diseñado para usarse como prueba diagnóstica con fines terapéuticos, para ayudar a los médicos a identificar a pacientes con cáncer de mama que pueden ser aptos para el tratamiento con PIQRAY® (alpelisib) a partir de la detección de un resultado de mutación de *PIK3CA*. Los pacientes cuyo tejido FFPE o material de muestra de plasma producen un resultado positivo para la prueba con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit para la presencia de una o más mutaciones de *PIK3CA* son aptos para el tratamiento con PIQRAY (alpelisib). Los pacientes cuyo material de muestra de plasma presenten un resultado negativo en esta prueba deben someterse a una prueba de un material de muestra tumoral FFPE en busca de la presencia de mutaciones de *PIK3CA*.

El material de muestra tumoral FFPE se procesa mediante el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit para la preparación manual de las muestras. El material de muestra de plasma de sangre total venosa periférica anticoagulada con EDTA K<sub>2</sub> se procesa mediante el QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit para la preparación manual de las muestras. Para los dos tipos de material de muestra, el equipo Rotor-Gene Q (RGQ) MDx 5plex HRM se utiliza para la detección y la amplificación automatizada.

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit es un producto sanitario para diagnóstico in vitro.

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit está concebido para el uso por parte de personal cualificado en entornos profesionales de laboratorio.

# Limitaciones del procedimiento

- Es necesario leer y comprender este documento de instrucciones de uso en su totalidad antes del uso del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.
- 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.
- Es posible que las muestras con un resultado “No Mutation Detected” (Mutación no detectada) incluyan mutaciones de *PIK3CA* que no se pueden detectar con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.
- Datos de rendimiento analítico y clínico relacionados con la detección de las siguientes mutaciones de *PIK3CA*: E545A, E545D, Q546E, Q546R y H1047Y se determinaron mediante el uso únicamente de material de muestra de plasma artificial (ADN de la línea celular agregado a plasma), no mediante el uso de material de muestra clínico de la población de uso previsto.
- La detección de las mutaciones depende de la integridad del material de la muestra y del volumen de ADN amplificable que contiene dicho material. Debería repetirse el procedimiento de prueba cuando el análisis del ADN de la muestra indique que la cantidad o la calidad no es suficiente o la concentración es demasiado elevada para el análisis de mutación.
- El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se utiliza con el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Al igual que con todos los procedimientos de PCR, las muestras pueden contaminarse con fuentes externas de ADN del entorno del análisis y con ADN del control positivo. Extreme la precaución para evitar la contaminación de las muestras y los reactivos del kit.
- Si la muestra contiene un porcentaje de alelos mutantes inferior al que permite la detección con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, producirá un resultado “No Mutation Detected” (Mutación no detectada).

- Se desconoce si el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit presenta reactividad cruzada (que produce el resultado “Mutation Detected” [Mutación detectada]) a mutaciones de *PIK3CA* adicionales fuera de aquellas mencionadas como biomarcadores detectados por el kit.
- El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit es una prueba cualitativa. La prueba no proporcionará mediciones cuantitativas de la frecuencia de alelos mutantes (Mutant Allele Frequency, MAF) que contiene una muestra.
- Se desconoce el impacto en el rendimiento del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en el caso de que se introduzca contaminación microbiana durante los procedimientos del ensayo; por ello, los usuarios deben tomar las precauciones necesarias para evitar introducir contaminantes microbianos durante los procedimientos de prueba y no deben utilizar los componentes del kit si se observa evidencia de proliferación microbiana.
- El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit solo debe usarse con ADN extraído de tejido de cáncer de mama FFPE o material de muestra de plasma preparado a partir de sangre total venosa periférica anticoagulada con EDTA K<sub>2</sub> obtenida de pacientes con cáncer de mama.
- El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit solo debe utilizarse con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (para material de muestra de tejido) o con el QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (para material de muestra de plasma).
- El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit solo debe utilizarse cuando se utilicen todas las mezclas de reacción.
- Solo el personal especialmente formado y cualificado en los procedimientos de diagnóstico in vitro y en el funcionamiento de los equipos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM puede utilizar el producto.
- El producto es para uso exclusivo en el termociclador para real-time PCR de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Con este producto no se puede utilizar ningún otro termociclador con detección óptica en tiempo real.
- Para obtener unos resultados óptimos, es preciso que siga detenidamente las instrucciones indicadas en el *Manual de instrucciones de uso del theascreen PIK3CA RGQ PCR Kit*. No se recomienda la dilución de los reactivos, puesto que disminuiría el rendimiento.

- 
- Este manual está previsto para usarse con la versión 2.1 del software Rotor-Gene AssayManager con identificación del estado de mutación automatizada.
  - 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.

---

# Resumen y explicación de la prueba

La vía de señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) regula varias funciones celulares, incluidas la proliferación celular, la supervivencia, la regulación traslacional de la síntesis de proteínas, el metabolismo de la glucosa, la migración celular y la angiogénesis (1). Se han identificado mutaciones de sentido alterado somáticas activadoras del gen *PIK3CA* (subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol 3-quinasa) que aumentan la actividad de las quinasas de la proteína PI3K $\alpha$  en tejidos tumorales y se han vinculado a la transformación celular en muchos cánceres humanos diferentes (2), incluido el cáncer de mama con receptores hormonales positivos (HR+) (3).

El cáncer de mama es el cáncer que se diagnostica con mayor frecuencia en las mujeres y la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer (4). Se calculó que, en 2018, se diagnosticaría cáncer de mama a 266 120 mujeres en los Estados Unidos (lo que representa aproximadamente el 30% de todos los cánceres en mujeres) y que se registrarían 40 920 muertes (5). En Europa, se predijo que morirían 92 700 a causa de cáncer de mama en 2018 (6). El cáncer de mama en hombres es poco frecuente; el diagnóstico de cáncer de mama en pacientes hombres (4) es <1%; sin embargo, las recomendaciones de tratamiento son las mismas para ambos sexos.

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit es una prueba cualitativa de diagnóstico in vitro de PCR en tiempo real que se realiza en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Utiliza cebadores de amplificación refractaria de sistemas de mutaciones (Allele Refractory Mutation System, ARMS), sondas de hidrólisis y tecnologías de pinzas de PCR para detectar 11 mutaciones (Tabla 1) en los exones 7, 9 y 20 del oncogén *PIK3CA* con un fondo de ADN nativo (Wild-Type, WT).

**Tabla 1. Analitos de ensayo del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit**

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base
7	C420R	757	1258 T>C
9	E542K	760	1624 G>A
	E545A	12458	1634 A>C
	E545D	765	1635 G>T
	E545G	764	1634 A>G
	E545K	763	1633 G>A
	Q546E	6147	1636 C>G
	Q546R	12459	1637 A>G
20	H1047L	776	3140 A>T
	H1047R	775	3140 A>G
	H1047Y	774	3139 C>T

\* COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

---

# Principio del procedimiento

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit incluye seis mezclas de reacción distintas de amplificación mediante PCR:

- Cinco reacciones específicas de las mutaciones dirigidas a los exones 7, 9 y 20 del gen *PIK3CA*
- Una reacción de control dirigida al exón 15

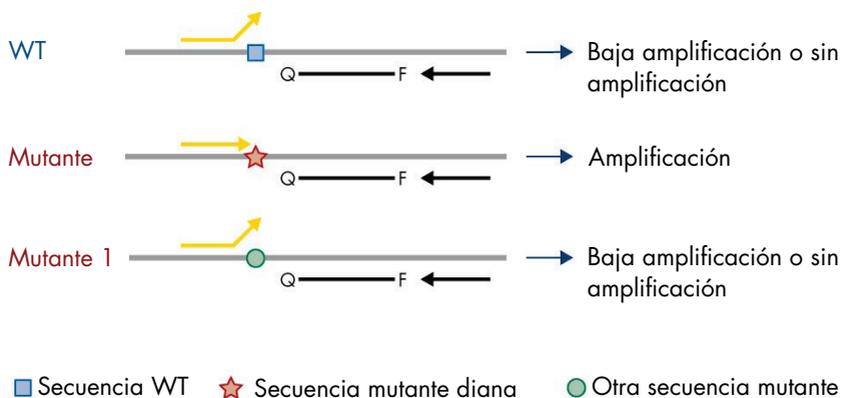
Los componentes principales del kit se explican a continuación.

## Mezclas para reacción de mutación

El ADN mutado se amplifica de forma selectiva y se detecta mediante mezclas de reacción específicas de las mutaciones utilizando cebadores de ARMS específicos de las mutaciones, sondas (sondas de hidrólisis y sondas cortas de elevada especificidad) y pinzas de PCR. Las reacciones de mutación se detectan en los canales Green, Yellow y Crimson del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

## ARMS

La amplificación específica de alelos se lleva a cabo mediante la tecnología ARMS, que utiliza la enzima ADN polimerasa *Taq* para diferenciar entre una coincidencia y un error de coincidencia de base en el extremo 3' de un cebador de PCR. Cuando la coincidencia con el cebador es completa, la amplificación se produce con total eficacia. Cuando no hay coincidencia con la base 3', únicamente puede producirse una amplificación de fondo de bajo nivel. Por lo tanto, las secuencias mutadas se amplifican de forma selectiva, incluso en muestras cuya mayoría de ADN no presenta la mutación (Ilustración 1).

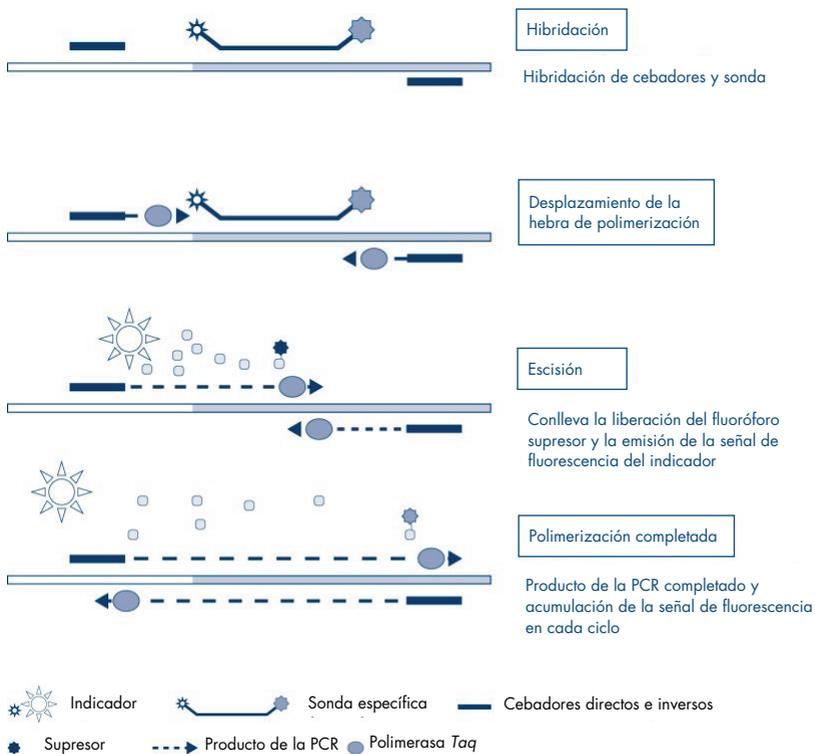


**Ilustración 1. Identificación de una mutación específica mediante PCR ARMS.** WT: nativo. Q—F: sonda de doble colorante. ⇄: cebadores directos e inversos.

## Sondas de hidrólisis

Las sondas de hidrólisis se hibridan dentro de una región de ADN amplificada mediante un conjunto de cebadores específico. Cuando la polimerasa *Taq* extiende el cebador y sintetiza la cadena naciente, la actividad de la exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa *Taq* degrada la sonda, lo que produce la liberación de fluoróforo y la emitancia de fluorescencia.

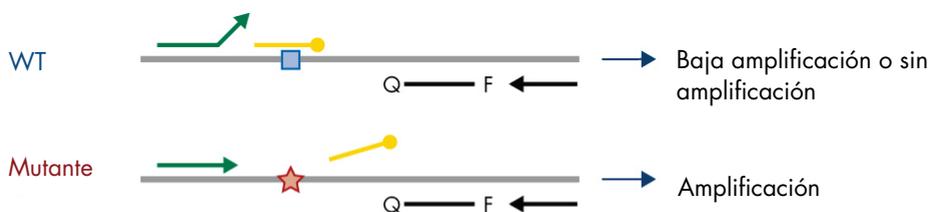
El aumento de la señal de fluorescencia se detecta únicamente si la secuencia diana es complementaria a los cebadores y la sonda y, por consiguiente, se amplifica durante la PCR (Ilustración 2).



**Ilustración 2. Principios de reacción con sondas de hidrólisis.**

## Pinza de PCR

Las pinzas de PCR permiten la amplificación selectiva del alelo mutante. Las pinzas de PCR perfectamente emparejadas con la secuencia nativa se unen al molde nativo y evitan la amplificación mediante interferencia de la elongación del cebador. El extremo 3' de la pinza de PCR se bloquea con la adición de un grupo de fosfatos para evitar la elongación de la secuencia nativa (Ilustración 3).



- Secuencia WT
- ★ Secuencia mutante diana
- oligonucleótido con fosfatos en 3' (PINZA)

**Ilustración 3. Tecnología de pinza de PCR.** WT: nativo. Q–F: sonda de doble colorante. ⇄: cebadores directos e inversos.

### Reacción para el control

La mezcla de reacción de control (tubo 1) contiene cebadores directo e inverso y una sonda etiquetada (detectados en el canal Green) para amplificar una secuencia corta del exón 15 del gen *PIK3CA*. La reacción de control se utiliza para determinar la existencia de un nivel adecuado de ADN amplificable en la muestra y como factor para los cálculos analíticos empleados para determinar el estado de la mutación.

### Control interno

Cada una de las mezclas de reacción contiene un control interno diseñado para detectar errores de la reacción (p. ej., provocados por la presencia de inhibidores). El control interno emplea una secuencia diana para oligonucleótidos que no está relacionada con *PIK3CA*, cebadores directos e inversos sin marcar y una sonda de hidrólisis marcada con un fluoróforo naranja.

### Control positivo

El control positivo (tubo PC) contiene una mezcla de cinco plásmidos que representan cada una de las 11 mutaciones y el control. La detección de las mutaciones dentro de intervalos aceptables confirma el correcto funcionamiento de cada una de las mezclas de reacción del kit.

---

## Control negativo

El control sin molde (tubo NTC) contiene agua exenta de nucleasas que se utiliza para la reacción del “control sin molde” (No Template Control, NTC). El NTC se utiliza como control negativo para identificar la posible contaminación durante la configuración del ensayo.

## Diluyente de muestras

El diluyente de muestras (tubo Dil.) contiene agua libre de nucleasas.

# Plataforma y software

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se ha diseñado específicamente para su uso con el equipo Rotor-Gene Q MDx, que funciona con un ordenador personal en el que se ha instalado lo siguiente:

- Rotor-Gene AssayManager®, versión 2.1
- Gamma Plug-in, versión 1.0.0
- Perfil de ensayo *therascreen*\_PIK3CA\_FFPE, versión 1.0.1 para el análisis de material de muestra de tejido
- Perfil de ensayo *therascreen*\_PIK3CA\_Plasma, versión 1.0.1 para el análisis de material de muestra de plasma

Consulte el *Manual del usuario del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* para obtener información sobre el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. El mantenimiento del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM debe realizarse según los requisitos indicados en el manual de usuario del equipo.

Consulte el *Manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* y el *Manual del usuario de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in* para obtener más información sobre el software.

## Parámetros de la serie analítica

El equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM está programado para distintos parámetros de ciclo (o "series") con los perfiles de ensayo *therascreen* PIK3CA. Los perfiles de ensayo contienen los parámetros de análisis de la PCR y se encargan de calcular los resultados. Los parámetros de termociclado de PCR para el ensayo son los siguientes:

- Consérvela a 95 °C durante 15 minutos para activar la enzima ADN polimerasa *Taq*.
- PCR para 45 ciclos de 95 °C durante 30 segundos para la desnaturalización y 60 °C durante 1 minuto para la hibridación y extensión.

# Materiales suministrados

## Contenido del kit

<b><i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (24)</b>		
<b>N.º de catálogo</b>		<b>873111</b>
<b>Número de reacciones</b>		<b>24</b>
<b>Contenido</b>	<b>Color de la tapa</b>	<b>Volumen</b>
PIK3CA Reaction Mix 1 (Mezcla de reacción 1 para PIK3CA)	Rojo	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 2 (Mezcla de reacción 2 para PIK3CA)	Morado	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 3 (Mezcla de reacción 3 para PIK3CA)	Naranja	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 4 (Mezcla de reacción 4 para PIK3CA)	Amarillo	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 5 (Mezcla de reacción 5 para PIK3CA)	Verde	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 6 (Mezcla de reacción 6 para PIK3CA)	Azul	750 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (ADN polimerasa <i>Taq</i> ) ( <i>Taq</i> )	Menta	85 µl
PIK3CA Positive Control (Control positivo de PIK3CA) (PC)	Beis	250 µl
Water for No Template Control (Agua para el control sin molde) (NTC)	Blanco	1,9 ml
Nuclease-free water for Dilution (Agua exenta de nucleasas para la dilución) (Dil.)	Blanco	1,9 ml
<i>Manual de instrucciones de uso del theascreen PIK3CA RGQ PCR Kit</i>		1

---

# Materiales requeridos pero no suministrados

Antes del uso, asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## Reactivos

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, n.º de catálogo 60404, consulte el apartado “Extracción de ADN de material de muestra FFPE”, en la página 29) o QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, n.º de catálogo 61504, consulte el apartado “Extracción de ADN de material de muestra de plasma”, en la página 29)
- Soluciones de degradación de PCR DNAZap™
- Desinfectante de alto nivel para laboratorio Distel y solución de lavado de alcohol isopropílico

## Consumibles

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, para uso con un rotor de 72 pocillos (QIAGEN, n.º de catálogo 981103 o 981106)
- Tubos de microcentrifugadora libres de nucleasas y de baja unión al ADN para la preparación de mezclas maestras
- Puntas de pipeta libres de nucleasas con filtros para aerosoles

## Equipo

- Marcador permanente
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (n.º de catálogo 9002032) o Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (n.º de catálogo 9002033)\* †
- Manual del usuario del Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in y perfil de ensayo "therascreen\_PIK3CA\_FFPE" o "therascreen\_PIK3CA\_Plasma"
- 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
- Centrifugadora de mesa\* con rotor para tubos de reacción de 1,5 ml
- Termomezclador, incubador orbital térmico\*, bloque térmico\* o baño de agua\* que permita la incubación a 56 °C, 70 °C y 90 °C
- Colector de vacóo QIAvac 24 Plus (n.º de catálogo 19413)
- QIAvac Connecting System (n.º de catálogo 19419)
- Vacuum Pump (n.º de catálogo 84010) o bomba equivalente que pueda producir un vacío de -800 a -900 mbar
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, bloque de aluminio para la preparación manual de las reacciones (QIAGEN, n.º de catálogo 9018901)
- Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes, bloque de aluminio para la preparación manual de las reacciones con pipeta de un solo canal en tubos de PCR de 96 x 0,2 ml, (QIAGEN, n.º de catálogo 9018905)
- 72-Well Rotor, para almacenar Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, con volúmenes de reacción de 10-50 µl; Requiere Locking Ring 72-Well Rotor (QIAGEN, n.º de catálogo 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor, para fijar Strip Tubes and Caps, 0.1 ml en el 72-Well Rotor (QIAGEN, n.º de catálogo 9018904)

\* 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.

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit está concebido para el uso por parte de personal cualificado en entornos profesionales de laboratorio.

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](http://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 uso exclusivo con el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Para obtener información de seguridad relativa al equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, consulte el manual del usuario que se entrega con el equipo.

Solo material de muestra de tejido: Para uso exclusivo con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Para obtener información de seguridad sobre el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (n.º de catálogo 60404), consulte el *Manual del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.

Solo material de muestra de plasma: Para uso exclusivo con el QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit.

Para obtener información de seguridad sobre el QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (n.º de catálogo 61504), consulte el *Manual del QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit*.

---

## Precauciones generales

- La prueba se ha diseñado para su uso con material de muestra de tejido de cáncer de mama FFPE o material de muestra de plasma con EDTA K<sub>2</sub> de pacientes con cáncer de mama.
- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. No es probable que el material de muestra FFPE y los ácidos nucleicos preparados a partir de dicho material presenten un riesgo de infección, pero todo el material de muestra de plasma debe tratarse como potencialmente peligroso. Siempre se deben cumplir los procedimientos institucionales de salud y seguridad.
- Deseche los residuos de materiales de muestra, muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.
- Los reactivos del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ofrecen 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.
- Todos los reactivos suministrados en el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. No sustituya los reactivos del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ni los mezcle con los de otros kits *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, ya que esto puede afectar al rendimiento.
- Utilice únicamente la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) suministrada con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. No la sustituya por ADN polimerasa *Taq* de otros kits de QIAGEN ni por ADN polimerasa *Taq* de otro proveedor.
- Consulte el manual del usuario del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM para conocer las advertencias, las precauciones y los procedimientos adicionales.
- No utilice componentes caducados o mal almacenados.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación de los reactivos para el control y la mezcla de reacción con los materiales sintéticos contenidos en el reactivo para el control positivo.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación cruzada entre muestras. Tape los tubos rápidamente tras añadir cada muestra.

- 
- Descontamine bien el bloque de carga antes de usarlo para la preparación de las mezclas maestras del ensayo. Se recomienda el uso de soluciones de degradación de PCR DNAZap seguidas de desinfectante de alto nivel para laboratorio Distel y solución de lavado de alcohol isopropílico. El bloque de carga debe estar seco antes de su uso.
  - Utilice pipetas individuales exclusivas para preparar las mezclas de reacción y añadir reactivos para el control positivo.
  - Lleve a cabo la preparación y dispensación de las mezclas de reacción en una área diferente de la utilizada para añadir el control positivo.
  - Las moléculas marcadas con fluorescencia incluidas en los reactivos de la mezcla de reacción son sensibles a la luz. Proteja los reactivos de control y de la mezcla de reacción de la luz para evitar el blanqueamiento.
  - No abra el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM hasta que haya finalizado la serie.
  - No abra los tubos Rotor-Gene Q hasta que haya finalizado la serie.
  - Es importante controlar que las pruebas de las muestras se realicen correctamente para evitar la introducción incorrecta de muestras, los errores de carga y los errores de pipeteo.

# Almacenamiento y manipulación de los reactivos

## Condiciones de envío

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se suministra en hielo seco y debe seguir congelado a la llegada. Si alguno de los componentes del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit no está congelado a la llegada, si el embalaje externo se ha abierto durante el transporte o si el envío no incluye la nota de embalaje, las instrucciones de uso o los reactivos, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN o un distribuidor local (visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Condiciones de almacenamiento

Una vez recibido, almacene inmediatamente el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en un congelador a una temperatura constante de entre  $-30$  y  $-15$  °C y protéjalo de la luz.

Si se almacena en las condiciones especificadas, el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

## Estabilidad

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

Los reactivos deben descongelarse a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora (y hasta un máximo de 4,5 horas) antes del uso. Cuando los reactivos están listos para ser utilizados, pueden configurarse las reacciones de PCR. Los tubos de Rotor-Gene Q, que contienen las mezclas maestras y la muestra de ADN, deben cargarse en el equipo Rotor-Gene Q MDx inmediatamente. El tiempo total desde el inicio de la configuración de la PCR hasta el inicio de la serie no debe superar las 7,5 horas si se realiza a temperatura ambiente.

---

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

**Nota:** Las moléculas marcadas con fluorescencia incluidas en los reactivos de la mezcla de reacción son sensibles a la luz. Proteja los reactivos de control y de la mezcla de reacción de la luz para evitar el blanqueamiento.

Los reactivos del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ofrecen una dilución óptima, por lo que no es necesario realizar más purificaciones ni ningún otro tratamiento antes de utilizarlos.

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.

# Manipulación y almacenamiento del material de muestra

## Manipulación del material de muestra: Tejido

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit está diseñado para usarse con ADNg extraído de material de muestra de tejido tumoral FFPE reseccionado y de material obtenido por punción con aguja gruesa (Core Needle Biopsy, CNB) de pacientes con cáncer de mama. Los tumores presentan una gran heterogeneidad en términos de genotipo y fenotipo. Los tumores positivos para mutaciones pueden contener ADN nativo y, por lo tanto, su histología puede mostrar regiones de tejido no tumoral.

Para preparar el material de muestra 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 un portaobjetos de vidrio.
- Recurra a un profesional cualificado (p. ej., un patólogo) para valorar una sección teñida con hematoxilina-eosina (H&E) y determinar el contenido tumoral y el área tumoral real (Effective Tumor Area, ETA). Marque el portaobjetos teñido para determinar la región de interés (Region of Interest, ROI). Utilice secciones en serie para realizar la extracción de ADN.

**Nota:** No utilice las secciones teñidas para extraer el ADN.

- Raspe el exceso de parafina localizado alrededor del tejido con un bisturí estéril nuevo y deséchelo.

### PRECAUCIÓN



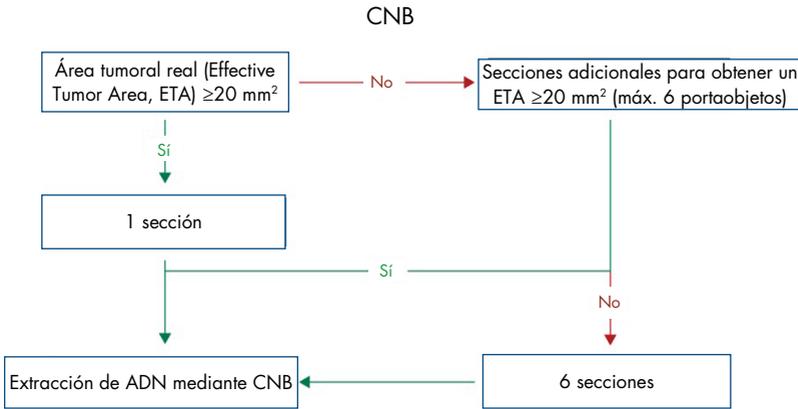
Utilice bisturíes secos. No lleve a cabo este paso en una corriente laminar ni en una campana de gases.

- 
- Raspe el tejido tumoral de las secciones y deposítelo en tubos de microcentrifugadora con un bisturí nuevo para cada material de muestra.

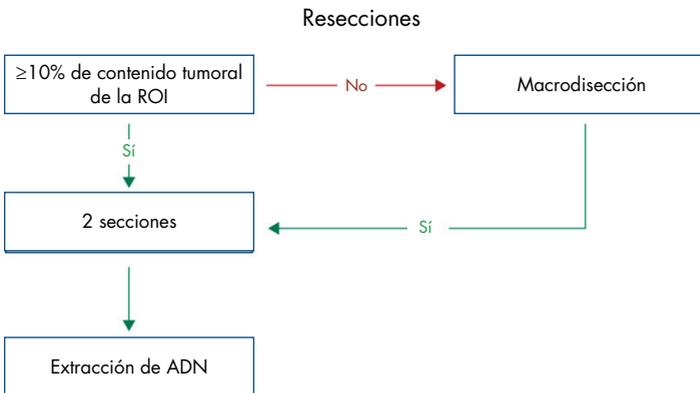
Etiquete, manipule y almacene las muestras tumorales, bloques, portaobjetos, muestras y tubos de microcentrifugadora listos para la extracción de una forma controlada según los procedimientos locales.

Existen dos flujos de trabajo independientes al utilizar material de muestra reseccionado de tejido tumoral FFPE y material de muestra FFPE obtenido por CNB (Ilustración 4).

A



B



**Ilustración 4. Flujo de trabajo de purificación del material de muestra clínico que se usará con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. A: CNB FFPE. B: Material de muestra de tejido tumoral reseccionado FFPE**

## Manipulación del material de muestra: Plasma

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit debe usarse con ADN aislado de material de muestra de plasma anticoaguladas con EDTA K<sub>2</sub> obtenidas de pacientes con cáncer de mama. Todo el material de muestra de plasma debe tratarse como potencialmente peligroso.

La sangre total venosa periférica extraída en tubos de recogida de sangre con EDTA K<sub>2</sub> debe procesarse para obtener plasma en un plazo de cuatro horas desde la recogida de la sangre. De lo contrario, puede producirse la contaminación por ADN genómico de la muestra. Para obtener más información sobre el aislamiento del plasma de sangre total, consulte el Apéndice A del *Manual del QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit*.

El material de muestra de plasma debe almacenarse a -80 °C. Todo el material de muestra de plasma debe equilibrarse a temperatura ambiente antes de su uso.

Etiquete, manipule y almacene el material de muestra, las muestras y los tubos de microcentrifugadora listos para la extracción de una forma controlada según los procedimientos locales.

## Almacenamiento de las muestras

Antes de la extracción del ADN, los bloques FFPE y los portaobjetos deben almacenarse a temperatura ambiente (15-25 °C) y el plasma debe almacenarse a -80 °C. El ADN puede almacenarse después de la extracción y antes de la prueba. Tabla 2 y Tabla 3 ofrecen directrices sobre el tiempo máximo y las condiciones recomendadas de almacenamiento para el material de muestra y el ADN después de la extracción.

**Tabla 2. Tiempos de almacenamiento recomendados para ADNg extraído de tejido FFPE**

Almacenamiento	Tiempo de almacenamiento máximo recomendado
Congelador (de -30 a -15 °C)	5 semanas
Nevera (2-8 °C)	1 semana
Congelador (-80 °C)	33 meses

**Tabla 3. Condiciones y tiempos de almacenamiento recomendados para plasma y ADNtc extraído de plasma**

Muestra	Almacenamiento	Tiempo de almacenamiento máximo recomendado
Plasma	Congelador (-80 °C)	11 meses
ADNtc extraído	Congelador (de -30 a -15 °C)	4 semanas

# Procedimiento

## Extracción de ADN de material de muestra FFPE

El ADN debe extraerse mediante el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (n.º de catálogo 60404).

**Nota:** El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se ha desarrollado con ADN extraído mediante el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. No utilice ningún otro producto de extracción de ADN.

Lleve a cabo la extracción del ADN de acuerdo con las instrucciones del *Manual del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* y tenga en cuenta las recomendaciones siguientes:

- Utilice el número de portaobjetos y volúmenes de elución recomendados en las siguientes secciones (“Material de muestra de resección (RES) de tejido FFPE” y “Material de muestra FFPE obtenido mediante CNB” en la página 30 de este manual).
- Si, tras la primera centrifugación, el tejido no se ha sedimentado, realice una centrifugación adicional.
- Asegúrese de utilizar etanol de grado para biología molecular\* en todos los pasos necesarios.
- Tras la eliminación del etanol, incube el tubo abierto a 15-40 °C durante 10 minutos para permitir que se evaporen los restos de etanol.

## Material de muestra de resección (RES) de tejido FFPE

- Si el material de muestra de RES tiene  $\geq 10\%$  de contenido tumoral en la región de interés (Region of Interest, ROI), raspe todo el tejido de dos secciones (4-5  $\mu\text{m}$ ) y deposítelo en tubos de microcentrifugadora etiquetados con un bisturí nuevo para cada material de muestra. Si el material de muestra tiene  $< 10\%$  de contenido tumoral en la ROI, realice una macrodissección y raspe solamente la ROI tumoral de dos secciones y deposítela en tubos de microcentrifugadora etiquetados con un bisturí nuevo para cada material de muestra.

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

- La digestión de la proteinasa K debe realizarse durante 1 hora para el material de muestra de tejido reseccionado.
- Para el material de muestra RES, el ADN<sub>g</sub> purificado debe eluirse en 120 µl de Buffer ATE (suministrado en el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit) tras 10 minutos de incubación en la columna.

### Material de muestra FFPE obtenido mediante CNB

- Para el material de muestra obtenido mediante CNB, utilice un número apropiado de secciones de 4-5 µm para obtener el área tumoral real (Effective Tumor Area, ETA) mínima necesaria de 20 mm<sup>2</sup> de un máximo de seis secciones. Utilice el número mínimo de secciones posible (1-6) para conseguir 20 mm<sup>2</sup> de ETA.
- Para material de muestra en el que no se puedan conseguir 20 mm<sup>2</sup> de ETA con un máximo de seis secciones, proceda a realizar la prueba con seis secciones.
- La digestión de la proteinasa K debe realizarse durante 1 hora para el material de muestra obtenido mediante CNB.
- Para el material de muestra obtenido mediante CNB, el ADN genómico purificado debe eluirse en 70 µl de Buffer ATE (suministrado en el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit) tras 10 minutos de incubación en la columna.

### Extracción de ADN de material de muestra de plasma

El ADN debe extraerse mediante el QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (n.º de catálogo 61504) con las estipulaciones descritas a continuación para purificar ADN<sub>t</sub> de material de muestras de plasma.

**Nota:** El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se ha desarrollado con ADN extraído mediante el QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit. No utilice ningún otro producto de extracción de ADN.

Lleve a cabo la extracción del ADN de acuerdo con las instrucciones para el “Protocolo clásico” del *Manual del QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit* y tenga en cuenta las recomendaciones siguientes:

- El volumen inicial de plasma es de 2 ml.
- Si no hay 2 ml disponibles, ajuste el volumen a 2 ml con tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline, PBS).
- Todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Desconecte el vacío entre pasos para garantizar que se aplique un vacío constante y uniforme durante los pasos del protocolo.
- El volumen de proteinasa K debe ser de 250 µl.
- El ADNtc purificado debe eluirse en 70 µl de Buffer AVE (suministrado en el QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit).
- El QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit solo debe usarse de forma manual.
- Asegúrese de utilizar etanol de grado para biología molecular\* en todos los pasos necesarios.
- Almacene el ADNtc purificado a una temperatura de entre –30 y –15 °C.

**Nota:** Todos los ensayos del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit generan productos de PCR cortos. Sin embargo, el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit no funciona correctamente con un ADN excesivamente fragmentado. El ADN extraído debe estar en el intervalo de funcionamiento de  $C_T$  de control ( $\geq 24,68$  y  $\leq 31,68$ ) para que la muestra sea válida.

## Detección de las mutaciones de *PIK3CA*

Este protocolo está diseñado para la detección de mutaciones de *PIK3CA*.

### Cuestiones importantes antes de comenzar

- Pueden evaluarse hasta 24 muestras en cuatro series mediante la mezcla de reacción para *PIK3CA* disponible en cada kit. El uso óptimo es en cuatro series, con un máximo de seis muestras en cada serie. Un tamaño de lote de muestras inferior implica una capacidad de análisis de muestras inferior con cada *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

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

- La muestra debe analizarse con todas las mezclas de reacción suministradas en el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.
- No es posible analizar lotes combinados de muestras derivadas tanto de material de muestra de tejido como de plasma en la misma serie de PCR; los lotes de PCR deben consistir únicamente de muestras derivadas completamente de tejido o de muestras derivadas completamente de plasma.
- No mezcle en vórtex la enzima ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) ni ninguna otra mezcla que contenga ADN polimerasa *Taq*, ya que esto inactivaría la enzima.
- Pipetee la enzima ADN polimerasa *Taq*. Para ello, introduzca con cuidado la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que el exterior de la punta se cubra de enzima en exceso.

### Antes de comenzar

- Asegúrese de que las series se realizan con el Rotor-Gene AssayManager v2.1, el Gamma Plug-in y el perfil de ensayo "*therascreen*\_PIK3CA\_FFPE" o el perfil de ensayo "*therascreen*\_PIK3CA\_Plasma". Compruebe que se haya instalado el software pertinente antes de utilizar el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM por primera vez y siga las instrucciones correspondientes al iniciar la serie y al analizar los datos ("Realizar una serie analítica de mutación de *PIK3CA*" en la página 38).
- Antes de cada uso, descongele por completo todos los reactivos, incluidas la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) y las muestras de ADN, durante 1 hora (y un máximo de 4,5 horas) a temperatura ambiente (15-25 °C), mézclelos invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifúgelos brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo.
- Asegúrese de que el bloque de carga de PCR se ha descontaminado (consulte "Precauciones generales", página 21) y secado correctamente.

## Procedimiento

1. Descongele todas las mezclas de reacción, el agua para control sin molde, la ADN polimerasa *Taq*, el control positivo para PIK3CA y las muestras de ADN a temperatura ambiente (15-25 °C) durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 4,5 horas.
2. Después de 1 hora, mezcle bien todos los reactivos invirtiendo cada tubo 10 veces para evitar las concentraciones localizadas de sales. Centrifugue brevemente todos los reactivos para que el contenido se deposite en el fondo del tubo.

**Nota:** No mezcle en vórtex la enzima ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) ni ninguna otra mezcla que contenga ADN polimerasa *Taq*, ya que esto inactivaría la enzima.

3. Etiquete seis tubos de microcentrifugadora (no suministrados) de acuerdo con la Tabla 4. Prepare cantidades suficientes de mezclas maestras (mezclas de reacción de control y mutación) más ADN polimerasa *Taq* para las muestras de ADN, una reacción de control positivo para PIK3CA y una reacción de control sin molde según los volúmenes de la Tabla 4. Las mezclas maestras contienen todos los componentes necesarios para la PCR excepto la muestra.

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

**Tabla 4. Preparación de las mezclas maestras del ensayo**

Tubo para mezcla de reacción	Volumen de mezcla de reacción ( $n^* + 3$ )	Volumen de ADN polimerasa <i>Taq</i> ( $n^* + 3$ )
Tubo RM 1	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Tubo RM 2	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Tubo RM 3	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Tubo RM 4	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Tubo RM 5	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Tubo RM 6	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$

\*  $n$  = número de muestras de ADN. El valor  $n$  no debe ser superior a seis, puesto que seis es el número máximo de muestras por serie analítica. Se incluyen tres reacciones adicionales para garantizar suficiente excedente para la configuración de la PCR y los controles.

4. Tape el tubo de la mezcla maestra e inviértalo 10 veces para mezclar bien la mezcla maestra. Centrifúguelo brevemente para asegurarse de que la mezcla se encuentre en el fondo del tubo.
5. En cuanto las mezclas maestras estén listas, coloque el número adecuado de tiras de 4 tubos para PCR (cada tira consta de cuatro tubos; no se suministran las tiras de 4 tubos para PCR) en el bloque de carga según el esquema de la Tabla 4. No tape los tubos de las tiras. Añada inmediatamente 20 µl de la mezcla maestra correspondiente en cada tira de tubos para PCR.

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

**Nota:** Consulte la Tabla 4 para conocer la disposición de los tubos durante la configuración de las mezclas maestras.

**Tabla 5. Esquema de la serie analítica en el bloque de carga para la detección de mutaciones de PIK3CA**

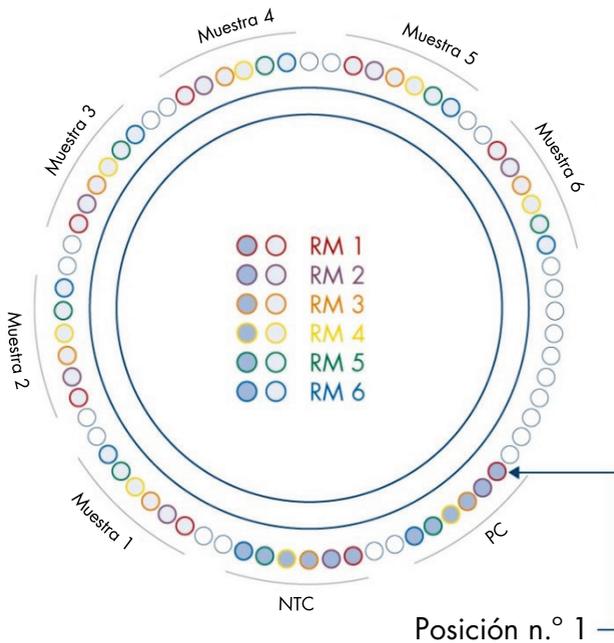
Ensayo	Controles		Número de muestras						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Tubo RM 1	1	9	17	25	33	41	49	57	E
Tubo RM 2	2	10	18	26	34	42	50	58	E
Tubo RM 3	3	11	19	27	35	43	51	59	E
Tubo RM 4	4	12	20	28	36	44	52	60	E
Tubo RM 5	5	13	21	29	37	45	53	61	E
Tubo RM 6	6	14	22	30	38	46	54	62	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

**Nota:** Cada tubo debería contener un volumen de reacción total de 25 µl (20 µl de la mezcla maestra preparada según la Tabla 4, más 5 µl de NTC/muestra/PC). Los números indican la posición en el bloque de carga y la posición final del rotor. E: Empty (Vacío).

6. Añada inmediatamente 5 µl de agua para control sin molde a los tubos de NTC (posiciones de tubos 9-14) y tápelos.
7. Añada 5 µl de cada muestra de ADN a los tubos de muestra y tápelos justo después de añadir cada muestra para evitar la contaminación cruzada entre las muestras.

- 
8. Añada 5 µl de control positivo para PIK3CA a los tubos de PC (posiciones de tubos 1-6) y tápelos.
  9. Con un rotulador permanente, marque los tapones de los primeros tubos de cada tira de 4 tubos para PCR (p. ej., posiciones 1, 5 y 9, etc.) para marcar la orientación de carga de los tubos en el rotor de 72 pocillos del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
  10. Coloque todas las tiras de 4 tubos para PCR en las posiciones correspondientes del rotor de 72 pocillos de acuerdo con el esquema para la serie (Tabla 5 e Ilustración 5). Tenga mucho cuidado de asegurarse de que los tubos se van a transferir a las posiciones correctas en el rotor de 72 pocillos (la posición de los tubos en el rotor de 72 pocillos debe ser la misma que la posición de los tubos en el bloque de carga).  
**Nota:** Todas las posiciones sin usar del rotor deben llenarse con tubos vacíos tapados. De este modo se garantiza la eficiencia térmica del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

	PC	NTC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Vacio
Mezcla de reacción 1 para PIK3CA	1	9	17	25	33	41	49	57	65
Mezcla de reacción 2 para PIK3CA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Mezcla de reacción 3 para PIK3CA	3	11	19	27	35	43	51	59	67
Mezcla de reacción 4 para PIK3CA	4	12	20	28	36	44	52	60	68
Mezcla de reacción 5 para PIK3CA	5	13	21	29	37	45	53	61	69
Mezcla de reacción 6 para PIK3CA	6	14	22	30	38	46	54	62	70
Vacia	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Vacia	8	16	24	32	40	48	56	64	72



**Ilustración 5. Configuración del rotor y la placa para un experimento con el *therascreen* PIK3CA RQ-PCR Kit.**  
 PC: control positivo M: muestra de ADN. NTC: control sin molde (agua).

PRECAUCIÓN

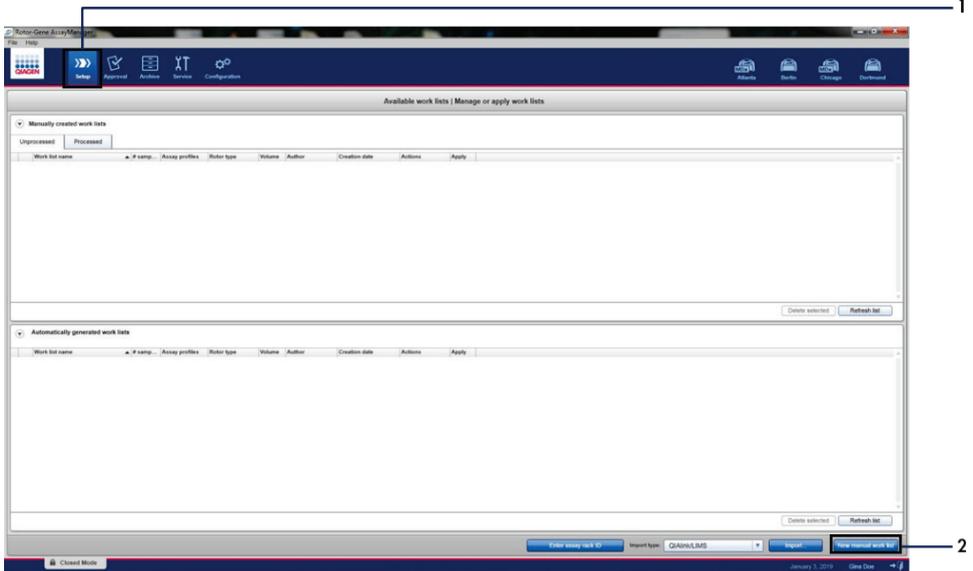


Los tubos deben insertarse en el rotor tal como se indica en la Ilustración 5, ya que el análisis automatizado configurado en el perfil de ensayo se basa en esta organización. Si se utiliza otra distribución, se alterarían los resultados.

11. Coloque inmediatamente el rotor de 72 pocillos en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Asegúrese de que el anillo de fijación (suministrado con el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) está colocado en la parte superior del rotor para proteger los tubos durante la serie y de que la tapa del equipo está cerrada.
12. Para iniciar la serie, siga las instrucciones indicadas en “Realizar una serie analítica de mutación de *PIK3CA*”, la siguiente sección.

## Realizar una serie analítica de mutación de *PIK3CA*

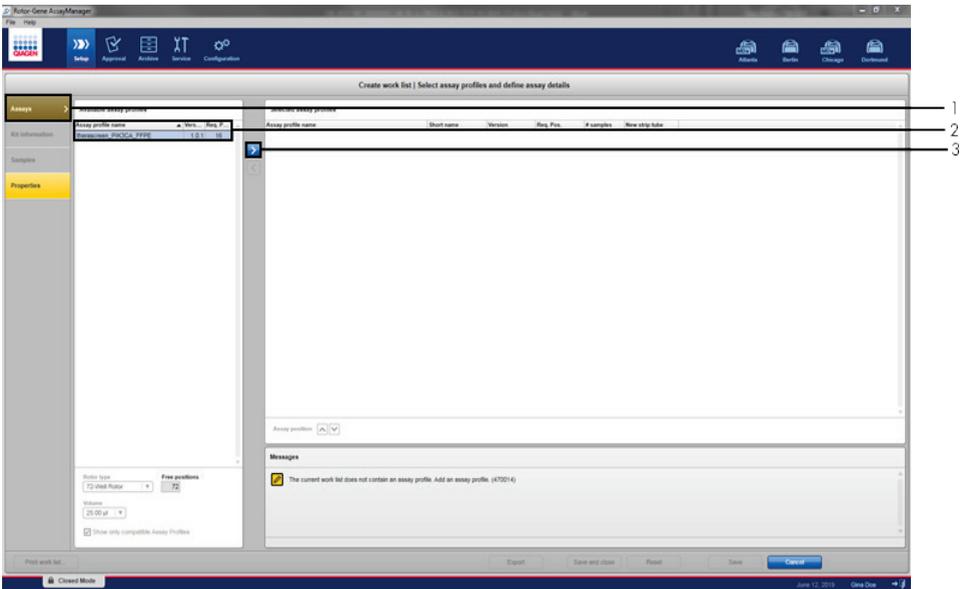
- Haga doble clic en el icono del Rotor-Gene AssayManager v2.1 situado en el escritorio del portátil conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. 
- El entorno "Setup" (Configuración) aparece por defecto. Haga clic en New manual worklist (Nueva lista de trabajo manual) para crear una nueva lista de trabajo (Ilustración 6).



**Ilustración 6. Configuración de una nueva lista de trabajo manual.** 1 = Pestaña "Setup" (Configuración), 2 = "New manual work list" (Nueva lista de trabajo manual).

15. Seleccione la pestaña “Assays” (Ensayos) en la parte izquierda de la ventana principal. Dependiendo del tipo de muestra, haga clic en el perfil de ensayo `therascreen_PIK3CA_FFPE` para muestras de tejido o en el perfil de ensayo `therascreen_PIK3CA_Plasma` para muestras de plasma en la lista de perfiles de ensayo disponibles y haga clic en la flecha azul para seleccionar el perfil de ensayo. Si el nombre del perfil de ensayo está truncado, pase el cursor sobre el perfil de ensayo para ver el nombre completo (Ilustración 7).

<b>PRECAUCIÓN</b>	Compruebe que ha seleccionado el perfil de ensayo correcto para el tipo de muestra.
-------------------	---



**Ilustración 7. Configuración de una nueva lista de trabajo manual: Selección del nombre del perfil de ensayo.**

1 = Pestaña “Assays” (Ensayos), 2 = Perfiles de ensayo disponibles con “`therascreen_PIK3CA_FFPE`” o “`therascreen_PIK3CA_Plasma`” seleccionado, 3 = Seleccione el perfil de ensayo.

16. En la ventana “Selected assay profiles” (Perfiles de ensayo seleccionados), introduzca el número de muestras de la prueba que se van a analizar, sin incluir el número de controles de la serie (Ilustración 8).

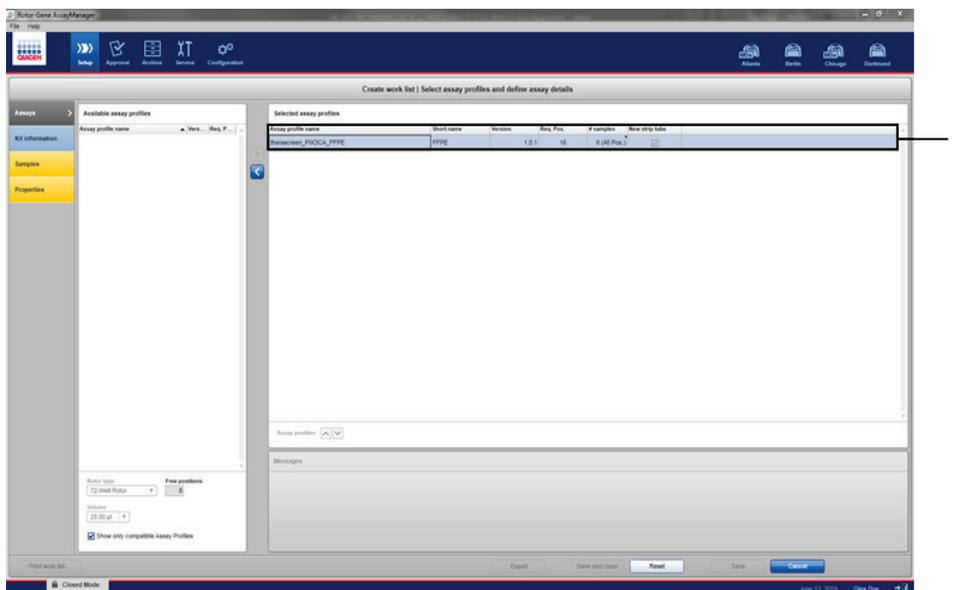
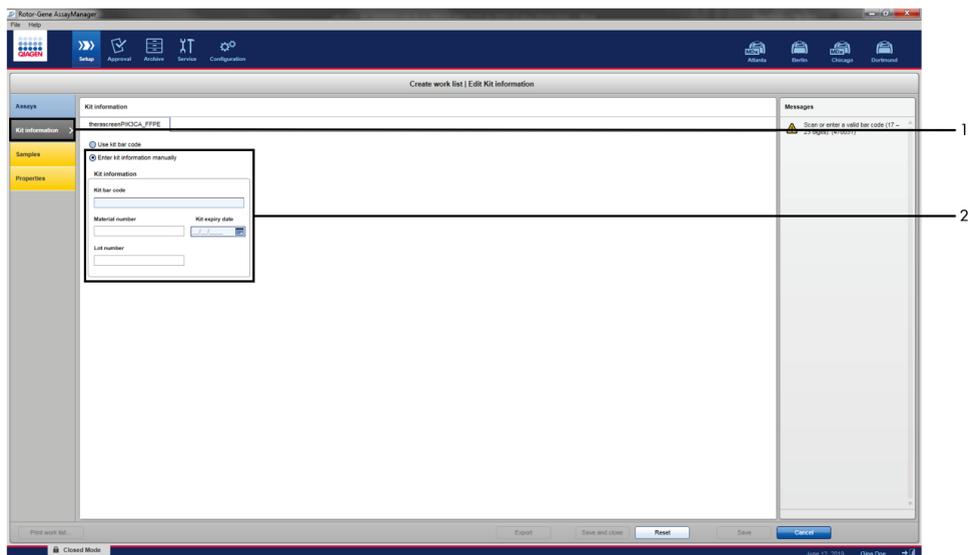


Ilustración 8. Ventana principal “Create work list” (Crear lista de trabajo). 1 = Añadir el número de muestras.

17. Haga clic en la pestaña “Kit Information” (Información del kit). Seleccione Enter kit information manually (Introducir información del kit manualmente) e introduzca la siguiente información del kit (Ilustración 9):

- Kit bar code (Código de barras del kit)
- Material number (Número de material)
- Lot number (Número de lote)
- Kit expiry date (Fecha de caducidad del kit)



**Ilustración 9. Ventana principal “Create work list” (Crear lista de trabajo).** 1 = Pestaña “Kit Information” (Información del kit), 2 = Introduzca la información del kit.

18. Haga clic en la pestaña “Samples” (Muestras) para introducir la información de la muestra. Introduzca los nombres de muestra manualmente (Ilustración 10).

**Nota:** Compruebe que ha introducido los nombres de muestra correctos antes de iniciar la serie del Rotor-Gene AssayManager.

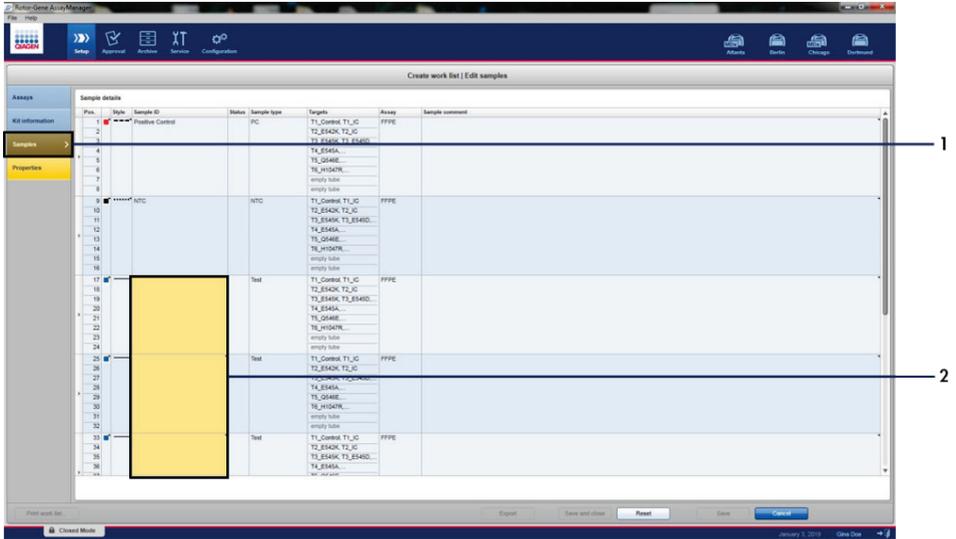
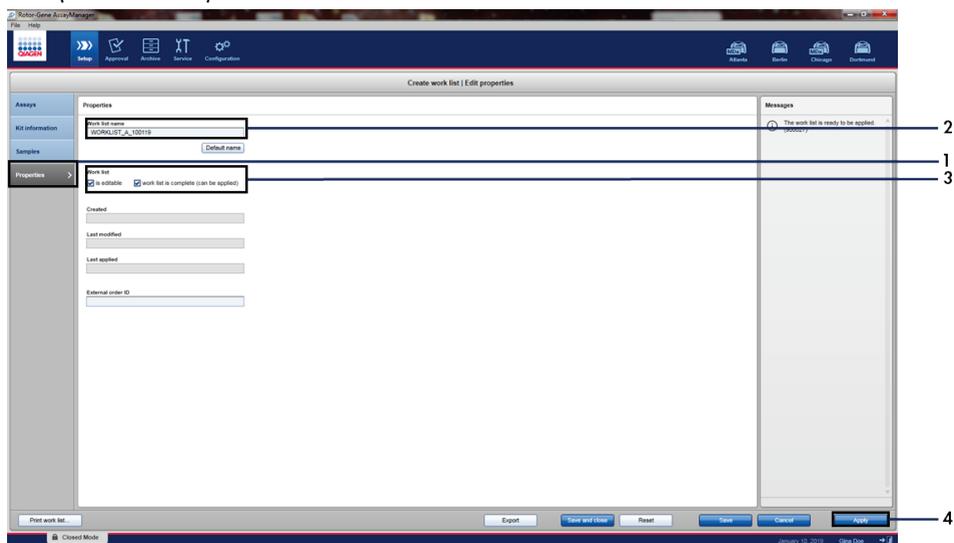


Ilustración 10. Ventana principal “Create work list” (Crear lista de trabajo). 1 = Pestaña “Samples” (Muestras), 2 = Introducción de los nombres de muestra.

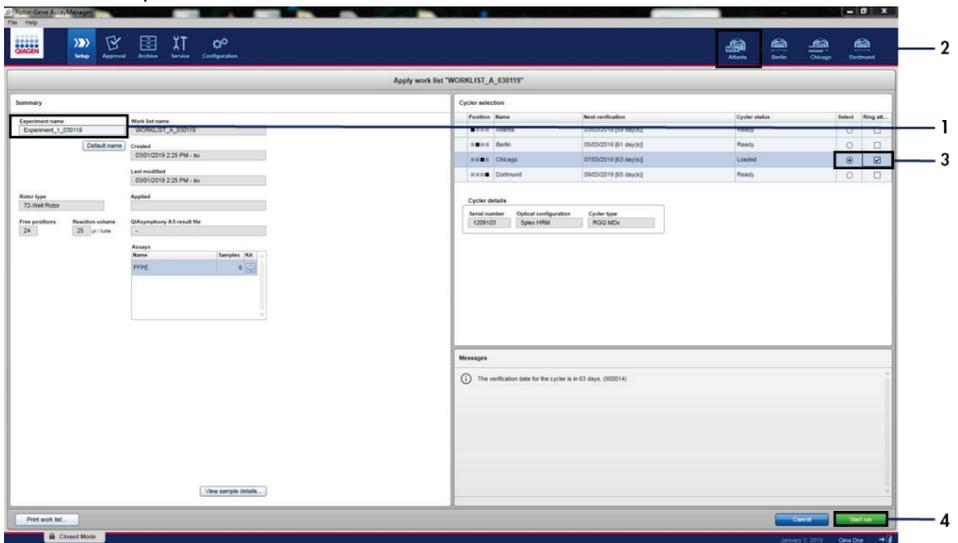
19. Haga clic en la pestaña "Properties" (Propiedades) e introduzca el nombre de la lista de trabajo. Una vez que haya introducido el nombre de la lista de trabajo, compruebe que las casillas de verificación is editable (es editable) y work list is complete (la lista de trabajo está completa) están marcadas. Haga clic en Apply (Aplicar) en la esquina inferior derecha para aplicar la lista de trabajo. Aparecerá una ventana nueva (Ilustración 11).



**Ilustración 11. Ventana principal "Create work list" (Crear lista de trabajo).** 1 = Pestaña "Properties" (Propiedades), 2 = Introducción del nombre de la lista de trabajo, 3 = Selección de "is editable" (es editable) y "work list is complete" (la lista de trabajo está completa), 4 = "Apply" (Aplicar).

20. Introduzca el nombre del experimento en el campo Experiment name (Nombre del experimento). Seleccione un termociclador de la lista de termocicladores disponibles y compruebe que la casilla de verificación Ring attached (Anillo acoplado) está marcada (Ilustración 12).

Una vez que haya realizado todos los pasos, haga clic en Start run (Iniciar serie). El icono RGQ en la parte superior izquierda de la pantalla se volverá verde para indicar que la serie se ha iniciado.



**Ilustración 12. Aplicar la lista de trabajo e iniciar la serie.** 1 = Introduzca el nombre del experimento, 2 = Selección del equipo, 3 = Compruebe que "Ring attached" (Anillo acoplado) está seleccionado, 4 = Inicie la serie.

**Nota:** El icono “Cycler” (Termociclador) cambia de aspecto dependiendo del progreso y del resultado de la serie. Puede encontrar las descripciones completas de estos iconos del termociclador en *Manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Algunos ejemplos de iconos del termociclador se muestran en la Ilustración 13.

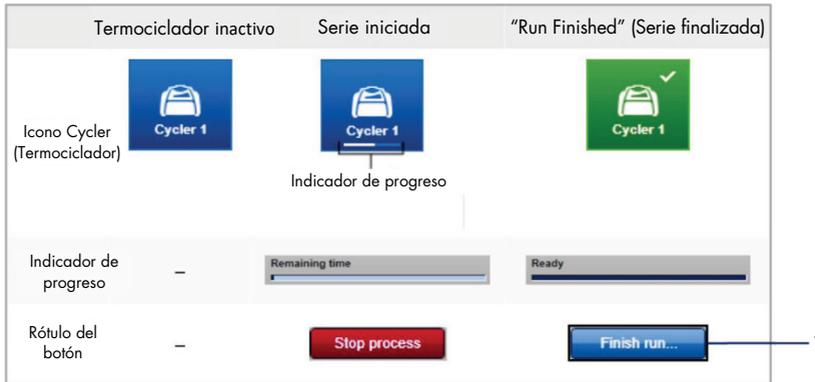


**Ilustración 13.** Iconos del termociclador que se pueden mostrar.

21. Cuando la serie haya finalizado, haga clic en Finish run (Finalizar serie). Se abrirá la ventana de diálogo "Release and go to approval" (Desbloquear y pasar a aprobación) (Ilustración 14).

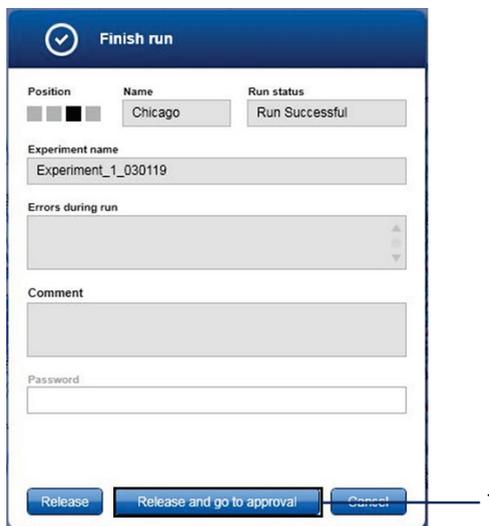
**Nota:** Durante el procesamiento de la serie se mostrarán las curvas de amplificación, que se actualizarán en tiempo real. Un indicador de progreso en la parte inferior izquierda mostrará el tiempo restante.

**Importante:** No cierre la ventana mientras la serie esté en curso.



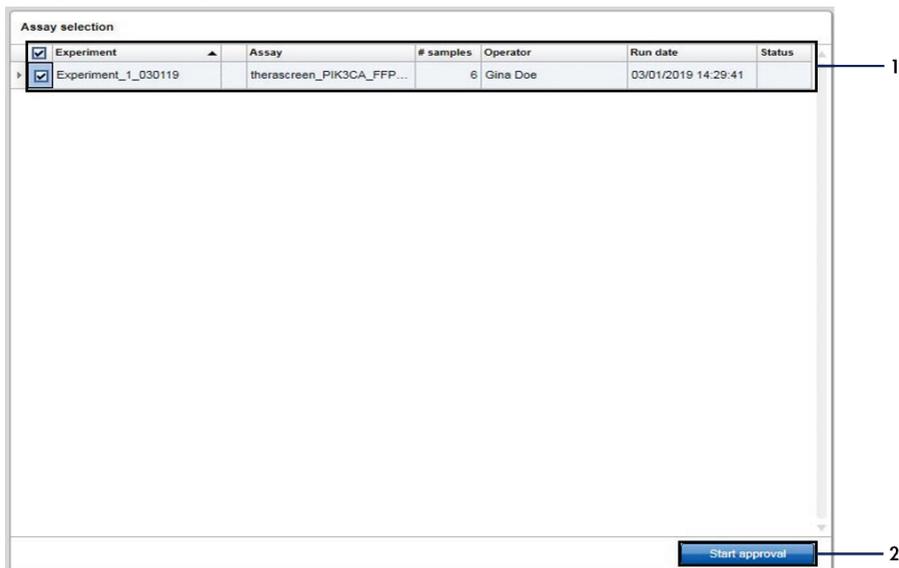
**Ilustración 14. Finalización de una serie.** 1: "Finish run" (Finalizar serie).

22. Haga clic en Release and go to approval (Desbloquear y pasar a aprobación) para entrar en la pestaña “Approval” (Aprobación) y desbloquear el equipo Rotor-Gene Q (Ilustración 15). El icono RGQ en la parte superior derecha de la pantalla cambiará de verde a azul para indicar que el equipo está listo para ejecutar otra serie. Independientemente de si una serie se realiza de forma correcta o no, la serie debe desbloquearse y aprobarse. Para consultar una lista de los posibles fallos y códigos de error que aparecen en Rotor-Gene AssayManager, consulte el *Manual del usuario de la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* y el *Manual del usuario del de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.



**Ilustración 15. Ventana emergente “Finish Run” (Finalizar serie).** 1 = “Release and go to approval” (Desbloquear y pasar a aprobación).

23. Seleccione el experimento en la parte de "Assay selection" (Selección de ensayos) del entorno "Approval" (Aprobación) y haga clic en Start approval (Iniciar aprobación) (Ilustración 16).



**Ilustración 16. Inicio del proceso de desbloqueo en el entorno "Approval" (Aprobación).** 1 = Ensayo seleccionado para su aprobación, 2 = "Start approval" (Iniciar aprobación).

La información de "Raw data" (Datos sin procesar), "Processed data" (Datos procesados), "Experiment" (Experimento), "Assay" (Ensayo) y "Audit trail" (Seguimiento de auditoría) puede encontrarse en la sección "Plots and information" (Gráficos e información) (1). Puede encontrar los resultados del ensayo en la sección "Results" (Resultados) (2).

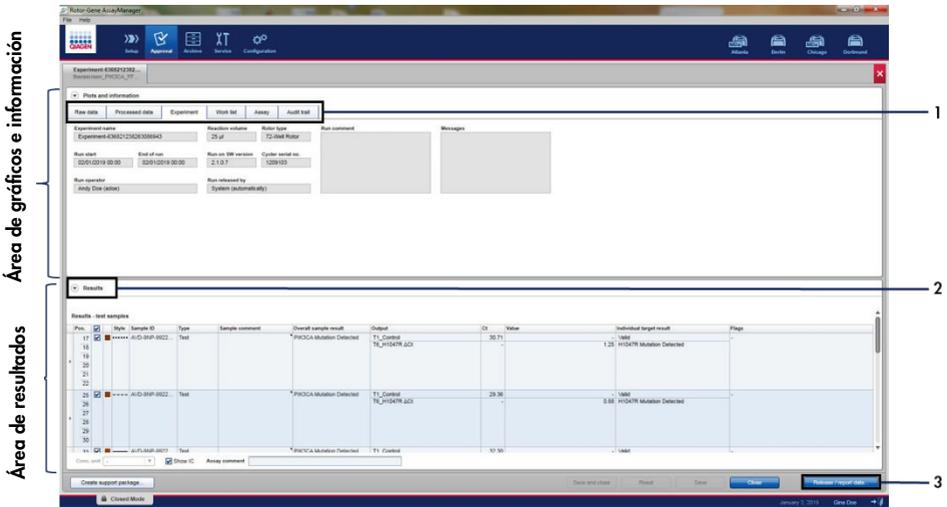
Si el control positivo y el control sin molde se hallan dentro del rango aceptable, en la columna "Sample status" (Estado de las muestras) se informará Valid (Válido); de lo contrario, se informará un estado de la muestra Invalid (No válido).

Si alguno de los controles de la serie falla, la serie se invalidará. Todas las muestras se marcarán como ASSAY\_INVALID.

Consulte el apartado “Marcadores del perfil de ensayo *therascreen* PIK3CA en Rotor-Gene AssayManager v2.1” (página 54) para obtener instrucciones sobre cómo proceder.

**Nota:** El perfil de ensayo contiene todas las reglas para el análisis automático de ensayos y muestras, así como para la interpretación de resultados. Por lo tanto, el software evaluará automáticamente la validez o falta de validez de las muestras y de los controles.

- Haga clic en Release/report data (Desbloquear/crear informe de datos). Se abrirá la ventana “Release/report data” (Desbloquear/crear informe de datos) (Ilustración 17).



**Ilustración 17. Ejemplo de ventanas principales de resultados de ensayo.** 1 = Pestaña “Experiment” (Experimento) en el área “Plots and information” (Gráficos e información). 2 = Área de resultados, 3 = “Release/report data” (Desbloquear/crear informe de datos).

25. Haga clic en OK (Aceptar) para guardar el experimento en el archivo y crear una salida de LIMS y un informe de la serie (Ilustración 18). Los informes de serie y las exportaciones de LIMS se guardarán en el directorio de informes predeterminado. Puede encontrar el directorio predeterminado en "Default data export directories" (Directorios de exportación de datos predeterminados), en la pestaña "Configuration" (Configuración).

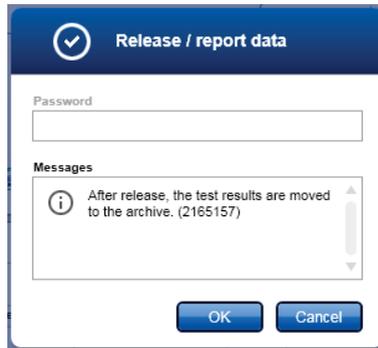
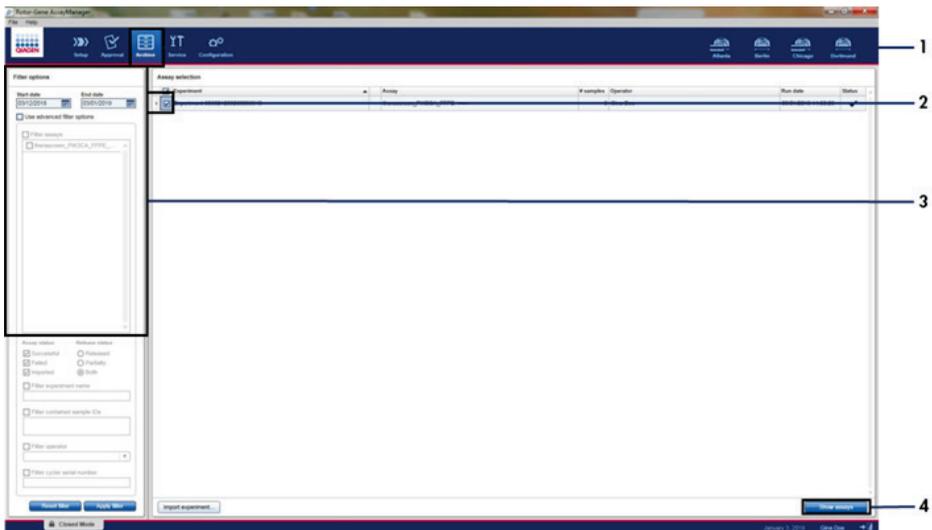


Ilustración 18. Ejemplo de la ventana "Release/report data" (Desbloquear/crear informe de datos).

26. Para ver un experimento guardado en el archivo de experimentos, haga clic en Archive (Archivo) y busque el experimento con los criterios de búsqueda de la sección “Filter Options” (Opciones de filtro). Haga clic en Apply filter (Aplicar filtro) para buscar. Seleccione un experimento marcando la casilla de verificación situada junto al experimento que desea ver y haga clic en Show assays (Mostrar ensayos) (Ilustración 19).



**Ilustración 19. Ejemplo de la ventana principal “Experiment Archive” (Archivo de experimentos).** 1 = Pestaña “Archive” (Archivo), 2 = Opciones de búsqueda, 3 = Selección del nombre del experimento, 4 = Pestaña “Show assays” (Mostrar ensayos).

# Resultados

El perfil de ensayo de *therascreen* PIK3CA 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 perfil de ensayo de *therascreen* PIK3CA para realizar el análisis y la identificación de las mutaciones.

## Análisis

El valor de  $C_T$  es el ciclo de PCR en el que la fluorescencia de una determinada reacción cruza el valor umbral predefinido determinado con el perfil de ensayo de *therascreen* PIK3CA. 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  $C_T$  más altos indican niveles más bajos de ADN introducido. Las reacciones en las que la fluorescencia cruza el valor umbral en este valor de  $C_T$ , o antes de él, se consideran positivas.

El hecho de utilizar la reacción del control para valorar la muestra de ADN permite determinar, a partir de los valores de  $C_T$  obtenidos, si las muestras contienen niveles de ADN adecuados para el análisis y si es necesario diluir las muestras antes de analizarlas.

La valoración de las muestras con las diferentes mezclas de reacción para mutación a fin de determinar los valores  $C_T$  respectivos permite que el perfil de ensayo de *therascreen* PIK3CA realice los cálculos necesarios para determinar el valor de  $\Delta C_T$  de la muestra con la siguiente ecuación:

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

A partir de los valores de  $C_T$  y  $\Delta C_T$  analíticos predeterminados, el perfil de ensayo *therascreen* PIK3CA lleva a cabo la determinación cualitativa del estado de mutación de las muestras de ADN e informa si una muestra contiene mutaciones.

---

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 hayan realizado correctamente.

Si el valor de  $C_T$  de control para la muestra está por debajo del intervalo aceptable, esto significa que la introducción de ADN es demasiado alta y que la muestra necesita diluirse, tal como se describe en la sección “Marcadores del perfil de ensayo *therascreen* PIK3CA en Rotor-Gene AssayManager v2.1”, página 54.

Todas estas valoraciones se realizan de forma automática y no requieren interpretación manual. El sistema comprueba automáticamente la validez de la serie y los criterios de validez de la muestra, y no informará del estado de mutación si la muestra o la serie no son válidas.

El software Rotor-Gene AssayManager v2.1 determina el resultado de cada analito biomarcador combinando todos los resultados de análisis pertinentes conforme a algoritmos de análisis fundamentales tales como la normalización y las reglas para muestras y ensayos definidas en el perfil de ensayo correspondiente.

Se pueden asignar los siguientes resultados a una muestra individual:

- PIK3CA Mutation Detected (Mutación PIK3CA detectada)
- No Mutation Detected (Mutación no detectada)
- INVALID (NO VÁLIDO): Si el software Rotor-Gene AssayManager v2.1 asigna a la muestra durante el análisis uno o más marcadores de muestras definidos para establecer el resultado del analito como “INVALID” (NO VÁLIDO), el analito obtiene el resultado “INVALID” (NO VÁLIDO).

**Nota:** Si ha ocurrido un error durante la serie, las muestras en el Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM deben desecharse y no volver a analizarse.

---

## Marcadores del perfil de ensayo *therascreen* PIK3CA en Rotor-Gene AssayManager v2.1

Todos los marcadores posibles que corresponden al Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in se enumeran en el *Manual de usuario de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

La Tabla 6 recopila los posibles marcadores que pueden generar los perfiles de ensayo de *therascreen* PIK3CA, 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 (PC) da error (FAIL).
- NTC\_INT\_CTRL\_FAIL = El control interno (INT\_CTRL) del control sin molde (NTC) da error (FAIL).
- SAMPLE\_CTRL\_HIGH\_CONC = El ensayo de control (CTRL) de la muestra (SAMPLE) tiene una concentración alta (HIGH\_CONC).

**Tabla 6. Marcadores de software utilizados en los perfiles de ensayo PIK3CA**

<b>Marcador</b>	<b>Significado</b>	<b>Acción</b>
IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	<p>Serie no válida.</p> <p>Valor de IC por encima del intervalo de especificación en tubos PC o NTC.</p> <p>Muestra no válida.</p> <p>IC de la muestra por encima del intervalo de especificación.</p>	<p>Repetir serie.</p> <p>Vuelva a analizar la muestra una vez; después del análisis, si el <math>C_T</math> de IC de la muestra sigue por encima del intervalo aceptable, vuelva a extraer la muestra. Si el IC de la muestra sigue por encima del intervalo aceptable después de volver a extraerla y de dos pruebas, la muestra debe informarse como "indeterminada".</p>
(PC)_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	<p>Serie no válida.</p> <p>PC por encima del intervalo de especificación.</p>	<p>Repetir serie.</p>
(PC)_BELOW_ACCEPTED_RANGE	<p>Serie no válida.</p> <p>PC por debajo del intervalo de especificación.</p>	<p>Repetir serie.</p>
IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	<p>Serie no válida.</p> <p>IC por debajo del intervalo de especificación en tubos PC o NTC.</p> <p>Muestra no válida.</p> <p>IC de la muestra por debajo del intervalo de especificación.</p>	<p>Repetir serie.</p> <p>Vuelva a analizar la muestra una vez; después del análisis, si el <math>C_T</math> de IC de la muestra sigue por debajo del intervalo aceptable, vuelva a extraer la muestra. Si el IC de la muestra sigue por debajo del intervalo aceptable después de volver a extraerla y de dos pruebas, la muestra debe informarse como "indeterminada".</p>
UNEXPECTED_CT_VALUE	<p>Serie no válida.</p> <p>El valor de <math>C_T</math> se ha detectado en el NTC.</p>	<p>Repetir serie.</p>
NO_CT_VALUE	<p>PC o IC no válido.</p> <p>Ningún valor de <math>C_T</math> para PC en los tubos de PC o para IC en los tubos de PC y NTC.</p> <p>Muestra no válida.</p> <p>Ningún valor de <math>C_T</math> en la muestra.</p>	<p>Repetir serie.</p> <p>Vuelva a analizar la muestra una vez; después del análisis, si sigue sin haber <math>C_T</math> de IC de la muestra, vuelva a extraerla. Si sigue sin haber IC de la muestra después de volver a extraerla y de dos pruebas, la muestra debe informarse como "indeterminada".</p>

La tabla continúa en la página siguiente

**Tabla 6. Marcadores de software utilizados en los perfiles de ensayo PIK3CA, cont.**

<b>Marcador</b>	<b>Significado</b>	<b>Acción</b>
DNA_INPUT_TOO_HIGH	Muestra no válida. Valor de $C_T$ de control de la muestra por debajo del intervalo de funcionamiento del control.	La concentración de la muestra es demasiado elevada y debe diluirse. Siga las instrucciones de la sección "Valor de $C_T$ de control", página 56.
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Muestra no válida. Valor de $C_T$ de control de la muestra por encima del intervalo de funcionamiento del control.	Vuelva a analizar la muestra una vez; después del análisis, si el valor de $C_T$ de control de la muestra sigue por encima del intervalo de funcionamiento del control, vuelva a extraer la muestra. Si el valor de $C_T$ de control sigue por encima del intervalo de funcionamiento del control después de volver a extraerla y de dos pruebas, la muestra debe informarse como "indeterminada".
T1_CONTROL_NO_CT_VALUE	Muestra no válida. Ningún valor de $C_T$ para la muestra en los tubos de control de muestra.	Vuelva a analizar la muestra una vez; después del análisis, si la muestra no tiene $C_T$ , vuelva a extraerla. Si la muestra sigue sin tener $C_T$ después de volver a extraerla y de dos pruebas, la muestra debe informarse como "indeterminada".

**Nota:** Si una muestra que ha vuelto a analizarse no es válida por otro motivo al realizar la repetición, esto sigue clasificándose como una segunda repetición y la muestra debe volver a extraerse.

## Valor de $C_T$ de control

Hay dos posibles marcadores para una muestra no válida debido al valor de  $C_T$  de control:

- **DNA\_INPUT\_TOO\_HIGH:** La concentración de la muestra es demasiado elevada y sobrecargará los ensayos de mutación. Para obtener un resultado de muestra válido, la muestra debe diluirse. Las muestras se deben diluir partiendo de la base de que diluir a la mitad aumentará el valor de  $C_T$  en 1. Es necesario diluir las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para la dilución [Dil.]).

Para calcular la desviación necesaria de  $C_T$  de control ( $X_R$ ) y estimar el factor de dilución necesario (Tabla 7):

$$X_R = 25 - X \text{ (material de muestra FFPE)}$$

$$X_R = 27 - X \text{ (material de muestra de plasma)}$$

donde a 25 (para material de muestra FFPE) o 27 (para material de muestra de plasma) se le otorga el  $C_T$  de control objetivo para la muestra diluida y  $X$  es un  $C_T$  de control real de la muestra que se va a diluir.

Si  $X$  no es un número entero, redondee al siguiente número entero, por ejemplo, 2,1 se redondea a 3,0. Este valor es  $X_R$ . Obtenga el factor de dilución necesario en la Tabla 7.

**Tabla 7. Cálculo del factor de dilución**

$X_R$	Factor de dilución	Cociente de muestra	Cociente de dilución
1	2 veces	1	1
2	4 veces	1	3
3	8 veces	1	7
4	16 veces	1	15
5	32 veces	1	31
6	64 veces	1	63
7*	128 veces	1	127
8*	256 veces	1	255

\* Solo para plasma.

- ABOVE\_ACCEPTED\_RANGE y T1\_CONTROL\_NO\_CT\_VALUE: La cantidad de ADN es insuficiente para realizar el análisis de mutación. Vuelva a analizar la muestra donde haya disponible suficiente ADN eluido (>30  $\mu$ l). Si la cantidad de ADN sigue siendo insuficiente en el nuevo análisis, vuelva a extraer secciones de FFPE nuevas o material de muestra de plasma nuevo. Si no es posible, la muestra debe informarse como "indeterminada".

---

# Características del rendimiento: Material de muestra de tejido

## Rendimiento analítico: Material de muestra de tejido

Las características de rendimiento específicas del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se determinaron mediante estudios en los que se utilizó material de muestra FFPE extraído a pacientes con cáncer de mama y 12 unidades de material muestra de línea celular humano FFPE (material de muestra de línea celular FFPE) que contiene mutaciones conocidas de *PIK3CA* detectadas mediante el ensayo y un material de muestra de *PIK3CA* nativo (es decir, sin mutaciones según se indicó en la detección del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en los exones 7, 9 y 20).

## Límite de blanco (LoB): Material de muestra de tejido

El LoB se define en la directriz EP17-A2 del CLSI como “el resultado de medición más elevado que es probable observar (con una probabilidad establecida) en una muestra de blanco”. Para el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit este es el punto de datos que corresponde al percentil del 95% superior en las muestras con resultados negativos para mutaciones. El LoB se determinó mediante el análisis de 56 unidades de material de muestra (30 unidades de material de muestra obtenido por RES y 26 unidades de material de muestra obtenido por CNB) analizadas por duplicado por muestra para cada uno de los tres lotes de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y se generaron 336 puntos de datos en total. Se verificó que los valores de LoB para cada ensayo de mutación (en términos de  $\Delta C_T$ ) detectados por el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit estaban por encima de los valores de corte de  $\Delta C_T$  determinados para cada ensayo y se resumen a continuación, junto con los índices de resultados falsos positivos obtenidos.

**Tabla 8. Resumen de resultados de LoB**

Exón	Mutación	Cambio de base	LoB (valor de $\Delta C_t$ )	Tasa de resultados positivos falsos (%)
7	C420R	1258T>C	7,57	0,94
9	E542K	1624G>A	5,09	1,88
	E545A	1634A>C	13,03	0,00
	E545D	1635G>T	9,19	0,31
	E545G	1634A>G	13,03	0,00
	E545K	1633G>A	6,74	1,57
	Q546E	1636C>G	13,03	0,00
	Q546R	1637A>G	8,72	0,00
20	H1047L	3140A>T	12,63	0,94
	H1047R	3140A>G	9,80	1,25
	H1047Y	3139C>T	7,61	0,63

## Límite de detección (LoD): Material de muestra de tejido

Se realizó un estudio para determinar el LoD de cada una de las 11 mutaciones de *PIK3CA*. 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 ( $C_{95}$ ). Los LoD para los 11 ensayos de mutación de *PIK3CA* del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se informan como MAF. Para determinar el LoD de cada mutación, se preparó material de muestra clínico FFPE de cáncer de mama o ADN de línea celular FFPE con diferentes porcentajes de mutación con concentraciones bajas de ADN introducido; para ello, se diluyeron en serie en un entorno nativo clínico FFPE. Para cada mutación de *PIK3CA*, se evaluó el porcentaje de identificaciones correctas en todos los niveles de dilución mediante tres lotes diferentes del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit con el análisis de 24 duplicados por lote de kit por cinco a seis niveles de MAF. El LoD de cada ensayo se calculó mediante un método “probit” (Tabla 9). El valor del LoD final para cada mutación se determinó como el valor máximo (en términos de MAF) en todos los lotes del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Para comprobar el LoD, se analizaron muestras de mutación con el LoD determinado y se verificó la tasa de pruebas positivas en el estudio de repetibilidad y reproducibilidad.

**Tabla 9. El LoD para el material de muestra de tejido establecido mediante muestras con concentraciones bajas de ADN introducido derivadas de material de muestra clínico FFPE y material de muestra de línea celular FFPE**

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base	LoD (% de MAF)
7	C420R	757	1258T>C	2,41 <sup>†</sup>
9	E542K	760	1624G>A	5,47 <sup>‡</sup>
	E545A	12458	1634A>C	3,54 <sup>†</sup>
	E545D	765	1635G>T	2,69 <sup>‡</sup>
	E545G	764	1634A>G	4,98 <sup>‡</sup>
	E545K	763	1633G>A	4,13 <sup>‡</sup>
	Q546E	6147	1636C>G	4,50 <sup>†</sup>
	Q546R	12459	1637A>G	6,08 <sup>‡</sup>
20	H1047L	776	3140A>T	2,56 <sup>‡</sup>
	H1047R	775	3140A>G	3,13 <sup>‡</sup>
	H1047Y	774	3139C>T	14,04 <sup>†</sup>

MAF: frecuencia de alelos mutantes.

\* COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

<sup>†</sup> Valores del LoD establecidos mediante ADN de material de muestra de línea celular.

<sup>‡</sup> Valores del LoD establecidos mediante ADN de material de muestra clínico.

## Intervalo de entrada de ADN genómico: Material de muestra de tejido

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit no utiliza una concentración específica de ADN, según lo determinado por espectrofotometría. La introducción de ADN se basa en el resultado de  $C_T$  de la reacción de control, que se utiliza para indicar que hay suficiente ADN amplificable presente en la muestra. El intervalo de funcionamiento del  $C_T$  de control se determinó utilizando en total 20 muestras nativas FFPE generando 107 puntos de datos. El intervalo de funcionamiento de  $C_T$  de control se estableció utilizando intervalos de tolerancia calculados. El intervalo de  $C_T$  de la reacción de control se estableció entre 23,23 y 33,38 de  $C_T$ .

## Valores de corte de $\Delta C_T$ : Material de muestra de tejido

El valor de corte del ensayo es un valor de  $\Delta C_T$  específico utilizado para determinar si una muestra se clasifica como positiva o negativa para una mutación de *PIK3CA*. Las muestras que generan valores de  $\Delta C_T$  en el valor de corte, o por debajo de él, se clasifican como positivas para mutación de *PIK3CA* (es decir, "PIK3CA Mutation Detected" [Mutación PIK3CA detectada]) y los valores de  $\Delta C_T$  generados por encima del corte se clasifican como negativos para mutación de *PIK3CA* (es decir, "No Mutation Detected" [Mutación no detectada]). Se utilizó una mezcla de línea celular, material de muestra clínico y ADN de línea celular preextraído para establecer los valores de corte de cada mutación. Los cortes se escogieron con respecto a los siguientes parámetros: fracción de falsos positivos, fracción de falsos negativos y sensibilidad del ensayo.

El valor de corte para cada ensayo del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se indica en la Tabla 10.

**Tabla 10. Valores de corte para cada ensayo de mutación al analizar ADN de material de muestra de tejido**

Ensayo	Valor de corte ( $\Delta C_T$ )
C420R	$\leq 6,0$
E542K	$\leq 4,8$
E545A	$\leq 10,0$
E545D	$\leq 7,5$
E545G	$\leq 9,5$
E545K	$\leq 6,5$
Q546E	$\leq 10,0$
Q546R	$\leq 7,0$
H1047L	$\leq 10,0$
H1047R	$\leq 7,0$
H1047Y	$\leq 6,2$

## Efecto del ADN introducido sobre los valores de $\Delta C_T$ (linealidad): Material de muestra de tejido

El nivel de ADN introducido se define como la cantidad total de ADN amplificable en una muestra según lo determinado por los valores de  $C_T$  de la reacción de control de *PIK3CA*. Para demostrar que el rendimiento del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se mantiene estable en todo el intervalo de  $C_T$  de la reacción de control (de 23,23 a 33,38), se preparó una dilución en serie de 9 niveles con niveles variables de ADN introducido, con los niveles superior e inferior fuera del intervalo de funcionamiento de  $C_T$  de la reacción de control (23,23-33,38  $C_T$ ) y se evaluó con muestras con resultado positivo para mutación. Se utilizaron tres tipos diferentes de material de muestra en este estudio: material de muestra de resección de FFPE clínico, material de muestra FFPE de línea celular y ADN<sub>g</sub> preextraído de líneas celulares. Las MAF se mantuvieron constantes mientras variaba el ADN introducido. Los valores objetivo de  $C_T$  para los niveles de dilución 1 y 9, para cada mutación, fueron aproximadamente 23,00 y 33,50, respectivamente. Ambos valores se dirigieron para que estuvieran fuera del intervalo de  $C_T$  de la reacción de control.

La evaluación se realizó mediante un lote de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit con tres duplicados analizados por nivel de ADN. Los datos se analizaron mediante análisis de regresión para determinar el intervalo lineal. Para que el ensayo se considere lineal en todo el intervalo de ADN introducido, no debe haber cambios en todo el intervalo en  $\Delta C_T$ , es decir, no hay efecto lineal, cuadrático o cúbico estadísticamente significativo. En resumen, los valores de  $\Delta C_T$  medidos en diferentes niveles de ADN total introducido se mantuvieron coherentes en todo el intervalo de trabajo del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit con respecto a las mutaciones E542K, E545D, E545G, E545A, H1047Y, Q546E, C420R y H1047R, es decir, estos ensayos no mostraron un valor de  $p$  estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) para los efectos lineales, cuadráticos y cúbicos ajustados para todos los modelos analizados. Los ensayos de E545K, Q546R y H1047L no son lineales para  $\Delta C_T$  en todo el intervalo de ADN introducido analizado. Se observó un intervalo lineal para el ensayo de E545K entre  $C_T$  24,08 y 31,02. Se observó un intervalo lineal para el ensayo de Q546R entre  $C_T$  24,28 y 32,69. Se observó un intervalo lineal para el ensayo de H1047L entre  $C_T$  25,74 y 31,61.

---

Una investigación determinó que los efectos no lineales no afectaban al rendimiento de los ensayos de E545K y H1047L. Sin embargo, se determinó un efecto en el rendimiento del ensayo de Q546R; las muestras en el LoD pueden identificarse como resultados negativos falsos cuando el ADN introducido es alto (aproximadamente  $C_T$  de control 23); pero la probabilidad de que esto ocurra es muy baja, aproximadamente del 0,0052%.

## Especificidad del ensayo (reactividad cruzada/especificidad): Material de muestra de tejido

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se compone de seis mezclas de reacción diferentes: una única reacción de control que detecta una región en el exón 15 del gen *PIK3CA* y 11 ensayos de mutación que detectan mutaciones de *PIK3CA*. No existe ninguna reacción para medir específicamente la secuencia de *PIK3CA* nativa en los exones 7, 9 o 20. El resultado “No Mutation Detected” (Mutación no detectada) del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se infiere por la ausencia de cualquier resultado positivo de mutación.

Para evaluar si la reactividad cruzada entre mutaciones detectada mediante el ensayo se ha tenido en cuenta correctamente en la configuración de los valores de corte, se analizó material de muestra clínico con mutación positiva y material de muestra de línea celular por duplicado mediante tres lotes del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit con concentración baja de ADN introducido y % de MAF bajo, así como con concentración alta de ADN introducido y % de MAF alto (se generaron 240 puntos de datos en total). En este estudio, solo hubo una instancia de reactividad cruzada entre E545D y H1047R y una instancia entre C420R y H1047R. También hubo cuatro instancias de amplificación inespecífica mutante entre E545A y H1047L en la muestra con MAF alta. En resumen, 6/240 puntos de datos mostraron amplificación inespecífica mutante. Los seis puntos de datos que mostraban amplificación inespecífica mutante eran esporádicos e inconsistentes con otros duplicados de la misma muestra. Por lo tanto, estos resultados no se consideraron como consecuencia de la reactividad cruzada. Sin embargo, se observó reactividad cruzada de PCR entre H1047L y H1047R. Esta reactividad cruzada es unidireccional, es decir, si se observa una muestra de H1047R y H1047L doble, esto solo se informará como “H1047R Mutation Detected” (Mutación H1047R detectada). Esta regla se incorpora al algoritmo automatizado “*therascreen*\_PIK3CA\_FFPE” del perfil de ensayo.

---

## Interferencia: Material de muestra de tejido

### Efectos del tejido necrótico

Para evaluar la posible interferencia del contenido de tejido necrótico en el material de muestra FFPE de cáncer de mama en el rendimiento del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, se analizó el material de muestra clínico FFPE de SOLAR-1 tanto con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit como con análisis de secuenciación de alto rendimiento (next-generation sequencing, NGS). Se evaluaron un total de 180 muestras de material de *PIK3CA* sin mutación mediante NGS y 199 muestras de *PIK3CA* con resultado positivo para mutación mediante NGS, que incluían material de muestra obtenido mediante CNB y RES. Un patólogo identificó que el porcentaje de necrosis variaba entre el 0 y el 10% para las muestras con resultados negativos para mutación y entre un 0 y un 20% para las muestras con resultado positivo para mutación.

Para el material de muestra FFPE con resultado positivo y con resultado negativo para mutación, 20 muestras presentaron resultados con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit que no concordaban con los resultados de NGS esperados. Estos resultados fueron de 17 muestras con resultados positivos para mutación y dos con resultados positivos para mutación con menos del 5% de contenido necrótico, y una muestra con resultado positivo para mutación con menos del 10% de contenido necrótico; por consiguiente, es improbable que la necrosis sea el motivo de los resultados discordantes. Los resultados respaldan el uso del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit con material de muestra FFPE de cáncer de mama con hasta un 20% de tejido necrótico.

### Efectos de la hemoglobina y las sustancias exógenas

El efecto sobre el rendimiento del ensayo de las posibles sustancias interferentes introducidas del kit de extracción FFPE (una sustancia exógena) o de la muestra misma (hemoglobina) se midió comparando el  $\Delta C_T$  entre extractos con interferente añadido y extractos con control añadido de cada mutante y comparando las identificaciones correctas para muestras de ADN nativas.

---

Las sustancias exógenas presentes en el proceso de extracción de ADN analizadas fueron las siguientes:

- Cera de parafina
- Xileno
- Etanol
- Buffer ATL
- Proteinasa K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2

Las muestras a las que se iban a añadir interferentes exógenos se normalizaron primero a un  $C_T$  de 30,00 y, después, se diluyeron con nativa (también normalizada a  $C_T$  30,00) para darles el  $\Delta C_T$  esperado a una MAF que representara  $3 \times \text{LoD}$ . Las muestras a las que se añadió hemoglobina (interferente exógeno) durante el proceso de extracción no se normalizaron a  $C_T$  30,00 ni se diluyeron a  $3 \times \text{LoD}$  antes de evaluar la mutación, pero se utilizaron inmediatamente después de la extracción. De esta forma, se evitó eliminar cualquier variabilidad que el interferente pudiera haber introducido.

El estudio requirió la preparación de un conjunto de muestras de prueba y un conjunto de muestras de blanco (Buffer ATE para sustancias exógenas y agua para hemoglobina). El conjunto de muestras de prueba incluía todas las muestras mutantes y nativas con un interferente. El conjunto de muestras de blanco incluía muestras mutantes y nativas con una sustancia de control adecuada añadida. Las muestras analizadas con hemoglobina se añadieron durante el proceso de extracción para reflejar que esta se hubiera introducido a través de la muestra FFPE. La concentración de prueba de hemoglobina y el volumen de tejido estimado utilizados en el proceso de extracción se basaron en las directrices del CLSI (EP7-A2 del CLSI, Apéndice D, 2005, Interference Testing in clinical Chemistry; Approved Guideline [Directriz aprobada para pruebas de interferencias en química clínica]). La concentración de prueba recomendada de

---

hemoglobina indicada en EP07-A, Apéndice D, 2005 es 2 mg/ml. Las muestras analizadas con posibles interferentes exógenos se agregaron después de la normalización a  $C_T$  30,00 y la dilución a  $3 \times LoD$  a una concentración que representara el nivel más alto posible (el peor de los casos) de contaminación por arrastre del interferente en una muestra (concentración  $\times 10$ ). En total, se analizaron seis duplicados de cada combinación de muestra/interferente con un lote de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Todas las identificaciones de mutación tanto en muestras mutantes como nativas fueron las esperadas. Cuando se observó una diferencia significativa entre las muestras agregadas y las de control, dicha diferencia se encontraba en la precisión intermedia aceptable del ensayo y estaba, por lo tanto, dentro de la variabilidad inherente del ensayo. Los resultados demostraron que estas sustancias no interfirieron con los resultados de identificación del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

## Intercambiabilidad de lotes: Material de muestra de tejido

El sistema *therascreen* PIK3CA RGQ PCR utiliza el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit para el aislamiento de ADN, y el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit para la amplificación de ADN y la detección del estado de mutación de *PIK3CA*. Se demostró la reproducibilidad entre lotes a partir de tres lotes del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit y tres lotes del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. El porcentaje global de identificaciones correctas entre lotes para todas las muestras nativas y con resultado positivo para mutación fue del 96,8% (363/375).

## Manipulación del material de muestra: Material de muestra de tejido

Se examinó la reproducibilidad del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit a partir de secciones obtenidas de 11 bloques de material de muestra FFPE; cuatro muestras de cáncer de mama con mutación de *PIK3CA*, seis muestras de línea celular con mutación de *PIK3CA* y una muestra clínica nativa de cáncer de mama. Dos usuarios realizaron extracciones por triplicado en tres centros para cada material de muestra, lo que supone un total de 18 puntos de datos por material de muestra. En cada centro, se llevaron a cabo las pruebas con un lote del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit en combinación con un lote de los reactivos del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Todos los resultados válidos de material de muestra mutante y nativo generaron

---

el resultado de estado de mutación general esperado (identificación correcta = 100%, 18/18 para cada material de muestra). En todas las identificaciones de mutación de *PIK3CA* específica, la proporción de identificaciones correctas fue del 97,92%, lo que respalda las características de reproducibilidad y repetibilidad del *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit en la fase preanalítica de aislamiento del ADN.

## Repetibilidad y reproducibilidad: Material de muestra de tejido

Se investigó la precisión y la reproducibilidad del *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit mediante el análisis de ADN extraído de material de muestra FFPE clínico de cáncer de mama para las mutaciones de *PIK3CA* E542K, E545G, E545K, H1047L, H1047R y Q546R, y de material de muestra FFPE de línea celular para las mutaciones de *PIK3CA* C420R, E545A, E545D, H1047Y, Q546E y Q546R. En el estudio también se incluyó material de muestra clínico FFPE nativos de cáncer de mama (Tabla 11).

Para demostrar la repetibilidad, tres usuarios analizaron las muestras a dos niveles de mutación (LoD y 3 × LoD) por duplicado, con dos series al día, a lo largo de 20 días no consecutivos. El resultado fue 120 puntos de datos en un centro (ubicado en el Reino Unido), excepto para las muestras en el LoD con mutaciones E545A y Q546R de *PIK3CA*. Tres usuarios evaluaron muestras con mutaciones E545A y Q546R en el LoD durante seis días en un centro, con dos series y cuatro duplicados con un total de 144 mediciones para demostrar la repetibilidad. Cada usuario realizó dos series al día para comprobar la reproducibilidad (tres usuarios por centro) en dos centros adicionales (ambos ubicados en EE. UU.) durante 10 días para ofrecer 60 puntos de datos adicionales por cada centro adicional, excepto para las muestras en el LoD con mutaciones E545A y Q546R de *PIK3CA*. Tres usuarios evaluaron muestras en el LoD con mutaciones E545A y Q546R de *PIK3CA* durante seis días para dos centros más, con dos series y cuatro duplicados con un total de 144 mediciones por centro, 432 en total en los tres centros. En cada centro, se analizaron las muestras mediante dos lotes del *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit (tres lotes en tres centros). Se utilizaron entre uno y dos lotes de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit para extraer el ADN del material de muestra FFPE. Las muestras se prepararon a niveles bajos de ADN introducido, en los que se estableció como objetivo un valor de  $C_T$  de control de aproximadamente 30.

Las muestras con resultado positivo para mutación solo se analizaron con la mezcla de reacción de control y la mezcla de reacción pertinente de la mutación en cuestión. Las muestras nativas se analizaron con todas las mezclas de reacción.

Para cada muestra, la proporción de identificaciones correctas se muestra en la Tabla 11, para la repetibilidad.

**Tabla 11. Repetibilidad del ensayo: proporción de identificaciones correctas para las mutaciones de *PIK3CA* analizadas en muestras de ADN obtenidas de material de muestra de tejido FFPE**

Exón	Mutación	Nivel de mutación	Proporción fraccional de resultados válidos	Identificaciones correctas, %	IC del 95% bilateral inferior
NA	Nativa	NA	108/120	90,00	83,18
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	119/119	100,00	96,95
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	E545A	LoD*	144/144	100,00	97,47
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD	118/120	98,33	94,11
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
Q546R	LoD*	139/140	99,29	96,08	
	3 × LoD	119/119	100,00	96,95	
20	H1047L	LoD	117/120	97,50	92,87
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	117/120	97,50	92,87
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97

NA: No aplicable.

\* Tres usuarios evaluaron muestras en el LoD con mutaciones E545A y Q546R de *PIK3CA* durante seis días en un centro, con dos series y cuatro duplicados con un total de 144 mediciones.

**Tabla 12. Reproducibilidad del ensayo: proporción de identificaciones correctas para las mutaciones de *PIK3CA* analizadas en muestras de ADN obtenidas de material de muestra de tejido FFPE**

Exón	Mutación	Nivel de mutación	Proporción fraccional de resultados válidos	Identificaciones correctas, %	IC del 95% bilateral inferior
NA	Nativa	NA	222/240	92,50	88,41
7	C420R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
9	E542K	LoD	237/239	99,16	97,01
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD*	431/432	99,77	98,73
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	238/240	99,17	97,02
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545K	LoD	238/240	99,17	97,02
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	Q546E	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
Q546R	LoD*	421/424	99,29	97,95	
	3 x LoD	239/239	100,00	98,47	
20	H1047L	LoD	230/240	95,83	92,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047Y	LoD	234/240	97,50	94,64
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47

NA: No aplicable.

\* Tres usuarios evaluaron muestras en el LoD con mutaciones E545A y Q546R de *PIK3CA* durante seis días en tres centros, con dos series y cuatro duplicados con un total de 144 mediciones por centro, 432 en total.

Se utilizó un análisis de los componentes de varianza para estimar la desviación estándar para la variabilidad de la repetibilidad y la reproducibilidad entre kits, entre series, entre usuarios, entre equipos, entre días e intraserial. En todos los componentes de varianza, la desviación estándar (DE) total fue  $\leq 1,32 \Delta C_T$  para el LoD y  $\leq 0,63 \Delta C_T$  para 3 x LoD para todas las mutaciones de *PIK3CA* analizadas en las pruebas de reproducibilidad. En todos los

---

miembros del panel de mutaciones, la DE fue  $\leq 0,17 \Delta C_T$  para LoD y  $\leq 0,16 \Delta C_T$  para 3 x LoD entre lotes (intercambiabilidad de lotes). La DE para la variabilidad intraserial (repetibilidad) fue  $\leq 1,24 \Delta C_T$  para el LoD y  $\leq 0,53 \Delta C_T$  para 3 x LoD.

## Contaminación cruzada/contaminación por arrastre analítica: Material de muestra de tejido

El propósito de este estudio fue evaluar el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit al analizar muestras con un índice alto de mutación de *PIK3CA* junto con muestras con resultados negativos para mutación de *PIK3CA*. Este estudio investigó la probabilidad de contaminación cruzada durante todo el procedimiento de la prueba (extracción de ADN y análisis consiguiente con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit).

Este estudio se realizó con H1047R (la mutación con mayor prevalencia) y material de muestra FFPE nativo de línea celular. Se extrajeron dos conjuntos independientes de muestras denominados "Conjunto A" y "Conjunto B" según una matriz de extracción predefinida, diseñada para introducir riesgos de contaminación cruzada de muestras. Dos usuarios realizaron las extracciones. Se realizó un total de 18 extracciones (nueve por conjunto) para las muestras con resultado positivo para mutación (H1047R). Se realizó un total de 42 extracciones (21 por conjunto) para las muestras nativas. Los extractos se evaluaron en busca de mutaciones en diez series de PCR; el mismo usuario configuró cinco por conjunto de muestras de manera consecutiva utilizando el mismo equipo y el instrumento Rotor-Gene Q. No se configuró ninguna otra serie con este instrumento entre esas series. Los extractos se analizaron con la mezcla de reacción del ensayo de control (tubo 1 del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit) y la mutación en cuestión (tubo 6 del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit).

El porcentaje observado de identificaciones correctas de la mutación para muestras nativas válidas fue del 100%, lo que demuestra que las muestras mutantes que comparten la misma extracción de ADN y el mismo procedimiento de configuración de la serie no producen contaminación cruzada de las muestras nativas.

## Exactitud: Comparación con el método de referencia analítico (material de muestra de tejido)

Para demostrar la precisión del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en relación con un ensayo validado mediante NGS, se llevó a cabo un estudio de precisión con material de muestra FFPE clínico de pacientes con cáncer de mama aleatorizado en el ensayo clínico SOLAR-1 y para el que había cantidad suficiente de material de muestra disponible para realizar la prueba con el ensayo comparador de NGS. De estas 453 unidades de material de muestra clínico, 385 cumplieron los requisitos para material de muestra del comparador de NGS para el volumen de tejido y el contenido tumoral, mientras que 379 ofrecieron un resultado válido para NGS.

Se analizaron con NGS muestras con resultados válidos tanto con NGS como con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, con NGS como referencia, para valorar el porcentaje de concordancia positiva (PCP), el porcentaje de concordancia negativa (PCN) y el porcentaje de concordancia global (PCG). En la Tabla 13, se resumen estos porcentajes, junto con los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95% bilaterales, calculados mediante el método Clopper-Pearson exacto.

**Tabla 13. Análisis del grado de concordancia para material de muestra de tejido FFPE**

Medición	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95% bilateral
Porcentaje de concordancia positiva	99,0 (197/199)	96,4; 99,9
Porcentaje de concordancia negativa	90,0 (162/180)	84,7; 94,0
Porcentaje de concordancia global	94,7 (359/379)	92,0; 96,7

Para los 20 resultados discordantes del estado de mutación global, dos muestras con resultados negativos en el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit presentaron resultados positivos en NGS, mientras que 18 muestras con resultados positivos en el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit dieron resultados negativos en NGS. De las dos muestras con resultados negativos en el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit que tenían resultados positivos en NGS, el NGS detectó ambas a niveles de MAF por debajo del LoD del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. De las

18 muestras que el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit determinó como positivas y NGS determinó como negativas, 11 eran positivas de bajo contenido (dentro de un  $\Delta C_T$  del corte mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y, por lo tanto, muestras positivas de bajo contenido). Se detectó un caso como H1047L (3140A>T) mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, pero se detectó como H1047I (3139\_3140CA>AT) mediante el ensayo de NGS. No se identificó la causa subyacente para los seis resultados discordantes restantes.

La Tabla 14 muestra el porcentaje de concordancia positiva (PCP) del objetivo con NGS como método ortogonal.

**Tabla 14. Análisis del grado de concordancia para material de muestra de tejido FFPE por mutación específica**

Mutación*	Porcentaje de concordancia positiva (N)	IC del 95% bilateral
C420R	100,0 (4/4)	39,8; 100,0
E542K	100,0 (27/27)	87,2; 100,0
E545G	100,0 (3/3)	29,2; 100,0
E545K	100,0 (49/49)	92,7; 100,0
E545A	100,0 (2/2)	15,8; 100,0
Q546E	100,0 (1/1)	2,5; 100,0
Q546R	50,0 (1/2)	1,3; 98,7
H1047L	100,0 (12/12)	73,5; 100,0
H1047R	98,1 (101/103)	93,2; 99,8

\* Se detectaron 11 mutaciones de *PIK3CA* en material de muestra de tejido en el ensayo clínico SOLAR-1 (Tabla 15).

## Rendimiento clínico: Material de muestra de tejido

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit está diseñado para usarse como prueba diagnóstica con fines terapéuticos para ayudar a los médicos a identificar a pacientes con cáncer de mama que pueden ser aptos para el tratamiento con PIQRAY (alpelisib) a partir de la detección de uno o más resultados de mutaciones de *PIK3CA* en material de muestra de tejido tumoral de mama FFPE clínico.

### Datos de resultados clínicos

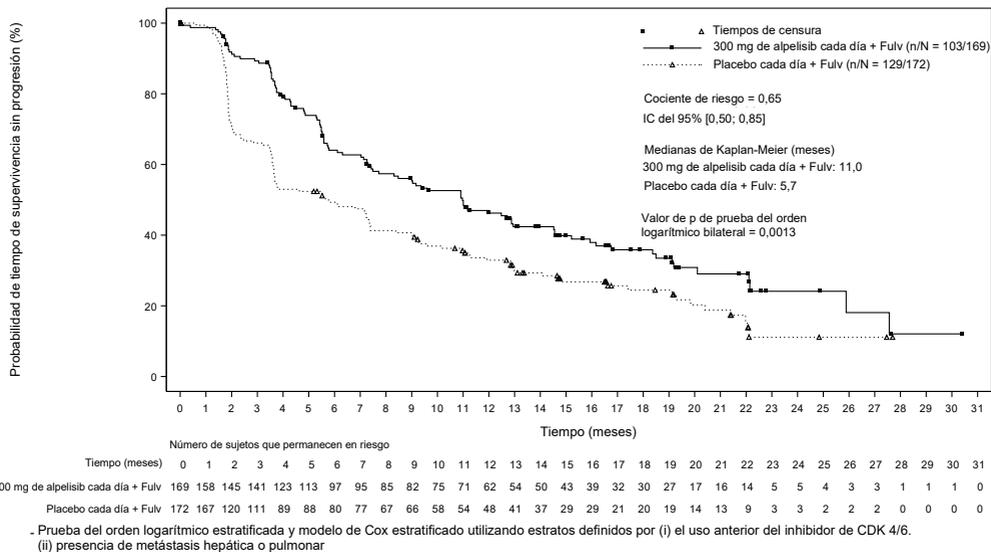
El estudio SOLAR-1, CBYL719C2301, fue un ensayo clínico aleatorizado, con enmascaramiento doble, controlado con placebo, internacional, multicéntrico de fase III para determinar la eficacia y la seguridad del tratamiento con PIQRAY (alpelisib) más fulvestrant frente a placebo más fulvestrant en hombres y mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama avanzado con HR+ y resultados negativos para HER2. Se inscribió a un total de 572 pacientes con cáncer de mama en dos cohortes, con o sin una mutación de *PIK3CA*. Los pacientes se aleatorizaron para recibir o bien 300 mg de PIQRAY (alpelisib) más fulvestrant, o bien placebo más fulvestrant, con una relación 1:1. La presencia de metástasis en el hígado o los pulmones y el tratamiento previo con inhibidores de CDK4/6 estratificó la aleatorización.

El criterio de valoración principal para el estudio fue la supervivencia sin progresión (SSP) mediante los Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST v1.1), con base en la valoración del investigador en pacientes con cáncer de mama avanzado con una mutación de *PIK3CA*. Otros criterios de valoración secundarios incluyeron SSP para pacientes sin mutación de *PIK3CA*, así como la supervivencia general (SG), la tasa de respuesta global (TRG) y la tasa de beneficio clínico (TBC) por cohorte de *PIK3CA* (es decir, con o sin mutación de *PIK3CA*).

El estado de mutación de *PIK3CA* para la selección y la inscripción de los pacientes se determinó de manera centralizada mediante el análisis de material de muestra tumoral de cáncer de mama FFPE utilizando un ensayo de pruebas clínicas (Clinical Trial Assay, CTA) o el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit de QIAGEN. De los 572 pacientes aleatorizados en SOLAR-1, 177 pacientes (30,9% de la población del estudio, incluidos 172 con resultados

positivos para la mutación de *PIK3CA* y cinco con resultados negativos para la mutación de *PIK3CA*) se aleatorizaron mediante el *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Todos los demás pacientes (395) se aleatorizaron mediante el CTA (69,1% de la población del estudio, incluidos 169 pacientes con resultados positivos para la mutación de *PIK3CA* y 226 con resultados negativos para mutación de *PIK3CA*).

PIQRAY (alpelisib) junto con fulvestrant demostró superioridad frente a fulvestrant por sí solo para el criterio de valoración principal de SSP, según la valoración del investigador mediante los criterios RECIST 1.1, en la cohorte con mutación de *PIK3CA*. Se observó una reducción del 35% en el riesgo de progresión de la enfermedad o de muerte a favor del grupo de PIQRAY (alpelisib) más fulvestrant en relación con el grupo de placebo más fulvestrant (cociente de riesgo [Hazard Ratio, HR] = 0,65; IC del 95%: 0,50; 0,85; p = 0,0013, con base en una prueba de rango logarítmico estratificada bilateral). La mediana de SSP se prolongó 5,3 meses con relevancia clínica, desde 5,7 meses en el grupo de placebo más fulvestrant a 11,0 meses en el grupo de PIQRAY (alpelisib) más fulvestrant (Ilustración 20).



**Ilustración 20. Diagrama de Kaplan-Meier de la SSP por tratamiento en los pacientes con mutación de *PIK3CA* aleatorizados en SOLAR-1.**

Las muestras de los 395 pacientes que se aleatorizaron mediante CTA se volvieron a analizar retrospectivamente mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y ofrecieron 389 muestras evaluables mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (98,5%), con seis muestras de pacientes no evaluables mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (Tabla 16).

**Tabla 15. Prevalencia de las mutaciones de PIK3CA detectadas mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en material de muestra de tejido en el ensayo clínico SOLAR-1**

Exón	Mutación*	ID COSMIC†	Cambio de base	Frecuencia en material de muestra de tejido N = 374 (%)
7	C420R	757	1258 T>C	6 (1,6)
9	E542K	760	1624 G>A	66 (17,6)
	E545A	12458	1634 A>C	4 (1,1)
	E545D	765	1635 G>T	6 (1,6)
	E545G	764	1634 A>G	9 (2,4)
	E545K	763	1633 G>A	91 (24,3)
	Q546E	6147	1636 C>G	1 (0,3)
	Q546R	12459	1637 A>G	2 (0,5)
20	H1047L	776	3140 A>T	24 (6,4)
	H1047R	775	3140 A>G	160 (42,8)
	H1047Y	774	3139 C>T	5 (1,3)

\* Un paciente con resultados positivos para mutación de PIK3CA puede tener más de una mutación.

† COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

N = número de pacientes con resultados positivos para mutaciones de PIK3CA identificados por material de muestra de tejido FFPE en el ensayo clínico SOLAR-1.

**Tabla 16. Disposición de los sujetos reanalizados retrospectivamente (inscritos mediante CTA) (conjunto de análisis completo, inscritos mediante CTA)**

Resultados del <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Positivo para CTA (N = 169)	Negativo para CTA (N = 226)	Total (N = 395)
Valid (Válido)	169 (100,0%)	220 (97,3%)	389 (98,5%)
Positive (Positivo)	164 (97,0%)	11 (4,9%)	175 (44,3%)
Negative (Negativo)	5 (3,0%)	209 (92,5%)	214 (54,2%)
Invalid (No válido)	0 (0%)	6 (2,7%)	6 (1,5%)

Para evaluar la concordancia entre el CTA y el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, se calcularon los índices de concordancia PCP, PCN y PCG junto con los correspondientes intervalos de confianza bilaterales del 95% calculados mediante el método Clopper-Pearson (exacto).

La Tabla 17 muestra el subconjunto evaluable mediante *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit con el CTA como referencia e indica un alto nivel de concordancia entre los resultados del CTA y el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

La Tabla 18 utiliza el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit como referencia e indica un alto nivel de concordancia entre los resultados del CTA y el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

**Tabla 17. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit frente a CTA (con el CTA como referencia)**

Medida de concordancia	Porcentaje de concordancia, %	IC del 95% bilateral
Porcentaje de concordancia positiva (PCP)	97,0	93,2; 99,0
Porcentaje de concordancia negativa (PCN)	95,0	91,2; 97,5
Porcentaje de concordancia global (PCG)	95,9	93,4; 97,6

**Tabla 18. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit frente a CTA (con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit como referencia)**

Medida de concordancia	Porcentaje de concordancia, %	IC del 95% bilateral
Porcentaje de concordancia positiva (PCP)	93,7	89,0; 96,8
Porcentaje de concordancia negativa (PCN)	97,7	94,6; 99,2
Porcentaje de concordancia global (PCG)	95,9	93,4; 97,6

La Tabla 19 muestra las estimaciones de PCP, PCN y PCG recalculados para ajustarlos para enriquecimiento debido a los seis resultados del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit que faltan en los pacientes con resultados negativos para mutación mediante CTA.

**Tabla 19. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit frente a CTA (con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit como referencia)**

Medida de concordancia	Porcentaje de concordancia, %	IC del 95% bilateral
Porcentaje de concordancia positiva (PCP)	93,6	90,1; 97,0
Porcentaje de concordancia negativa (PCN)	97,7	95,6; 99,5
Porcentaje de concordancia global (PCG)	95,9	93,8; 97,8

---

El análisis de SSP principal para establecer la utilidad clínica del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit demostró una eficacia clínica similar a la determinada por el estudio SOLAR-1. El análisis del subconjunto de pacientes con resultados positivos para mutación obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (347 pacientes) demostró que los pacientes aleatorizados en el grupo de PIQRAY (alpelisib) más fulvestrant tenían una reducción estimada del 36% del riesgo de progresión de la enfermedad o de muerte (HR = 0,64; IC del 95%: 0,48; 0,85) en comparación con los pacientes aleatorizados en el grupo de placebo más fulvestrant.

Los análisis de sensibilidad evaluaron el impacto de los datos ausentes del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit sobre la SSP y demostraron que los resultados eran sólidos, a pesar de los datos ausentes. Por ejemplo, si se supone que los seis resultados faltantes del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit eran discordantes con los resultados del CTA, aquellos pacientes con resultados positivos para mutación obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y aleatorizados en el grupo de PIQRAY (alpelisib) más fulvestrant tenían una reducción estimada del 37% del riesgo de progresión de la enfermedad o de muerte (HR = 0,63; IC del 95% [0,47; 0,84]) en comparación con los pacientes aleatorizados en el grupo de placebo más fulvestrant.

Todos los pacientes con resultados positivos para mutación inscritos en el CTA podían evaluarse mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, mientras que solo seis pacientes con resultados negativos para mutación inscritos en CTA no pudieron evaluarse mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Por consiguiente, no había sesgo en los resultados en cuanto a la posibilidad de evaluación de las muestras del estudio.

La SSP también se estimó en la población con resultados negativos obtenidos mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y no se observó beneficio alguno en la SSP en esos pacientes (HR = 0,85; IC del 95%: 0,58; 1,25).

---

# Características del rendimiento: Material de muestra de plasma

## Rendimiento analítico: Material de muestra de plasma

Las características de rendimiento específicas del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit se determinaron mediante estudios en los que se utilizó material de muestra de plasma clínico extraído a pacientes con cáncer de mama, material de muestra de plasma artificial que contenía plasma de donante sano al que se añadió ADN de línea celular de 11 unidades de material de muestra de línea celular humana que contiene mutaciones conocidas de *PIK3CA* detectadas mediante el ensayo y un material de muestra de línea celular nativa de *PIK3CA* (es decir, sin mutaciones según se indicó en la detección del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en los exones 7, 9 y 20).

## Límite de blanco (LoB): Material de muestra de plasma

El límite de blanco (Limit of Blank, LoB) se define en la directriz EP17-A2 del CLSI como “el resultado de medición más elevado que es probable observar (con una probabilidad establecida) en una muestra de blanco”. Para el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit este es el punto de datos que corresponde al percentil del 95% superior en las muestras de blanco. Para valorar el rendimiento del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en ausencia de molde y para garantizar que un material de muestra con ADN nativo no genere una señal analítica que pueda indicar una concentración baja de la mutación, se analizaron por triplicado 60 materiales de muestra únicos de donante sano a los que se añadió ADN de *PIK3CA* nativo, fragmentado y diluido en serie en seis niveles de entrada; este análisis se realizó en un estudio de conformidad con la directriz EP17-A2 del CLSI para determinar el LoB de cada ensayo de mutación. Todos los ensayos de mutación produjeron valores de LoB superiores al valor de corte para sus respectivas mutaciones. El LoB de los *PIK3CA* mutantes detectados por el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit para el material de muestra de plasma se muestra a continuación (Tabla 20).

**Tabla 20. Resumen de resultados de LoB**

Exón	Mutación	Cambio de base	LoB (valor de $\Delta C_T$ )	Tasa de resultados positivos falsos (%)
7	C420R	1258T>C	11,15	0%
9	E542K	1624G>A	8,32	0%
	E545A	1634A>C	15,82	0%
	E545D	1635G>T	9,13	0%
	E545G	1634A>G	13,39	0%
	E545K	1633G>A	15,74	0%
	Q546E	1636C>G	15,82	0%
	Q546R	1637A>G	10,19	0,56%
	H1047L	3140A>T	15,55	0,56%
20	H1047R	3140A>G	11,93	0%
	H1047Y	3139C>T	9,89	0%

## Límite de detección (LoD): Material de muestra de plasma

Se realizó un estudio para determinar el LoD de cada una de las 11 mutaciones de *PIK3CA* utilizando material de muestra de plasma artificial. 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 ( $C_{95}$ ).

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* PIK3CA RGQ PCR Kit (Tabla 21). El LoD de cada ensayo se calculó mediante un método "probit". Se estableció el LoD de 11 muestras mutadas artificiales mediante tres lotes diferentes del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit con el análisis de 24 muestras por lote de kit por nivel. Se verificó un subconjunto de las mutaciones utilizando muestras clínicas de plasma con el LoD determinado.

**Tabla 21. LoD de material de muestra de plasma determinado mediante material de muestra de plasma artificial y clínico con nivel bajo de ADN introducido**

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base	LoD, % de MAF
7	C420R	757	1258T>C	4,46 <sup>†</sup>
9	E542K	760	1624G>A	5,06 <sup>††</sup>
	E545A	12458	1634A>C	1,82 <sup>†</sup>
	E545D	765	1635G>T	3,21 <sup>†</sup>
	E545G	764	1634A>G	1,94 <sup>††</sup>
	E545K	763	1633G>A	2,42 <sup>††</sup>
	Q546E	6147	1636C>G	5,31 <sup>†</sup>
	Q546R	12459	1637A>G	4,22 <sup>†</sup>
20	H1047L	776	3140A>T	2,37 <sup>††</sup>
	H1047R	775	3140A>G	1,98 <sup>††</sup>
	H1047Y	774	3139C>T	7,07 <sup>†</sup>

MAF: frecuencia de alelos mutantes.

\* COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

<sup>†</sup> Valores del LoD establecidos mediante material de muestra de línea celular.

<sup>††</sup> Valores del LoD verificados mediante material de muestra de plasma clínico.

## Intervalo de entrada de ADN genómico: Material de muestra de plasma

El intervalo de funcionamiento de  $C_T$  de control se estableció utilizando intervalos de tolerancia y valores de LoB calculados. El intervalo de funcionamiento de  $C_T$  del ensayo de control se determinó utilizando en total 30 muestras nativas individuales de 10 ml que contenían diferentes concentraciones de ADN nativo (120 observaciones). El intervalo de funcionamiento de  $C_T$  del ensayo de control final se estableció como un valor de  $C_T$  de 24,69 a 31,68 que resulta en un nivel de confianza del 98% para el 95% de la población de uso previsto.

## Valores de corte de $\Delta C_T$ : Material de muestra de plasma

Se utilizó material de plasma artificial para establecer los valores de corte de cada mutación. Además del análisis estadístico de los valores de  $\Delta C_T$ , se utilizaron los valores de LoB de los requisitos de diseño para las tasas de resultados positivos falsos y negativos falsos para definir valores de corte aceptables.

Los valores de corte establecidos se indican en la Tabla 22.

**Tabla 22. Valores de corte establecidos para cada ensayo de mutación al analizar ADN de material de muestra de plasma**

Ensayo	Valor de corte ( $\Delta C_T$ )
C420R	$\leq 6,0$
E542K	$\leq 4,8$
E545A	$\leq 10,0$
E545D	$\leq 7,0$
E545G	$\leq 9,5$
E545K	$\leq 10,0$
Q546E	$\leq 10,0$
Q546R	$\leq 7,0$
H1047L	$\leq 10,0$
H1047R	$\leq 9,0$
H1047Y	$\leq 6,2$

---

## Efecto del ADN introducido sobre los valores de $\Delta C_T$ (linealidad): Material de muestra de plasma

El nivel de ADN introducido se define como la cantidad total de ADN amplificable en una muestra según lo determinado por los valores de  $C_T$  de la reacción de control de *PIK3CA*. Para demostrar que el rendimiento del *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit se mantiene estable en todo el intervalo de  $C_T$  de la reacción de control (de 24,69 a 31,68), se preparó una dilución en serie de 8 niveles para cada uno de los 11 ensayos de mutación de *PIK3CA* (ADN fragmentado extraído de material de muestra de línea celular). Los valores objetivo de  $C_T$  para los niveles de dilución 1 y 8, para cada mutación, se previeron para encontrarse por encima y por debajo del intervalo de  $C_T$  de la reacción de control. En resumen, los valores de  $\Delta C_T$  en los diferentes niveles de ADN introducido se mantuvieron coherentes en todo el intervalo de trabajo del *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit con respecto a las mutaciones.

## Especificidad del ensayo (reactividad cruzada/especificidad): Material de muestra de plasma

Para evaluar si la reactividad cruzada detectada mediante el ensayo se ha tenido en cuenta correctamente en la configuración de los valores de corte, se diluyó material de muestra de plasma artificial con mutación positiva, con nivel bajo y alto de ADN introducido, con objetivos de MAF alto y bajo y se analizó por duplicado utilizando tres lotes del *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Se observó reactividad cruzada entre los ensayos de H1047L y H1047R. Sin embargo, se determinó que esta reactividad cruzada es unidireccional (es decir, si se observa una muestra de H1047R y H1047L doble, esto solo se informará como "H1047R Mutation Detected" [Mutación H1047R detectada]). Esta regla se incorpora al algoritmo automatizado "*therascreen*\_PIK3CA\_Plasma Assay Profile".

---

## Interferencia: Material de muestra de plasma

### Sustancias endógenas

Las posibles sustancias interferentes endógenas que pueden encontrarse en el material de muestra de plasma se analizaron en muestras artificiales mutadas y nativas en concentraciones según la directriz EP7-A2 del CLSI:

- Hemoglobina (2 g/l)
- Triglicéridos (37 mmol/l)
- EDTA (3,4  $\mu\text{mol/l}$ )
- Cafeína (308  $\mu\text{mol/l}$ )
- Albúmina (30 mg/ml)
- Bilirrubina conjugada (342  $\mu\text{mol/l}$ )
- Bilirrubina no conjugada (342  $\mu\text{mol/l}$ )

Los resultados demostraron que estas sustancias no interfirieron con los resultados del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

### Sustancias exógenas

Se analizaron las posibles sustancias interferentes exógenas presentes en el proceso de extracción de ADN en muestras mutantes y nativas en concentraciones que presuponían una contaminación por arrastre del 10% procedente del proceso de extracción:

- Etanol
- Proteinasa K
- Buffer ACL
- Buffer ACB
- Buffer ACW1
- Buffer ACW2

Los resultados demostraron que estas sustancias no interfirieron con los resultados del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

---

## Intercambiabilidad de lotes: Material de muestra de plasma

El sistema *therascreen* PIK3CA RGQ PCR utiliza el QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit para la extracción de ADN, y el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit para la amplificación de ADN y la detección del estado de mutación de *PIK3CA*. Se demostró la reproducibilidad entre lotes y la intercambiabilidad a partir de tres lotes del QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit y un lote del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. El porcentaje global de identificaciones correctas entre lotes para todas las muestras nativas y con resultado positivo para mutación fue del 100%.

## Manipulación del material de muestra: Material de muestra de plasma

Para demostrar que los diferentes laboratorios producirán resultados aceptables al partir del mismo material de muestra de plasma, las extracciones se realizaron en tres centros diferentes. Se utilizó material de muestra artificial para las 11 mutaciones, así como un material de muestra de plasma clínico nativo de *PIK3CA*. Se prepararon 18 alícuotas de 2 ml de cada material de muestra que se aleatorizaron y se dividieron en 18 conjuntos de extractos. Estos conjuntos de extractos se distribuyeron luego de manera uniforme en los tres centros de pruebas (un centro interno de QIAGEN en el Reino Unido y dos centros externos adicionales en los EE. UU.); seis extractos por centro del estudio. Se realizó el análisis del ADN extraído de las alícuotas del material de muestra utilizando el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en el centro interno de QIAGEN. Al comparar los resultados de cada material de muestra de los tres centros, el porcentaje de identificaciones correctas de mutaciones para material de muestra nativo y con resultados positivos para mutación de *PIK3CA* fue del 100%.

## Repetibilidad y reproducibilidad: Material de muestra de plasma

Se investigó la repetibilidad del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit mediante pruebas de ADN extraído de material de muestra de línea celular, que representó las 11 mutaciones detectadas por el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit a 1 × LoD y 3 × LoD.

Se evaluó la repetibilidad mediante el análisis de las muestras en un centro durante 20 días no consecutivos, utilizando equipos Rotor-Gene Q y tres usuarios para generar un total de 120 duplicados por muestra (Tabla 23).

**Tabla 23. Repetibilidad del ensayo: proporción de identificaciones correctas para las mutaciones de *PIK3CA* analizadas en muestras de ADN obtenidas de material de muestra de plasma**

Exón	Mutación	Nivel de mutación	Proporción fraccional de resultados válidos	Identificaciones correctas, %	IC del 95% bilateral inferior
NA	Nativa	C <sub>T</sub> 30	114/120	95,00	89,43
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	E542A	LoD	119/120	99,17	95,44
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	119/120	99,17	95,44
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD*	111/120	92,50	86,24
		3 × LoD*	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
Q546R	LoD*	115/120	95,83	90,54	
	3 × LoD*	120/120	100,00	96,97	
20	H1047L	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	110/120	91,67	85,21
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 × LoD	120/120	100,00	96,97

\* Para E545K y H1047R los LoD utilizados fueron 1,99 y 1,44, respectivamente. El LoD se reajustó y se confirmó en un estudio posterior. El LoD reajustado se utilizó en el estudio posterior (Tabla 24).

---

La reproducibilidad se midió al analizar muestras artificiales con nivel de 1 × LoD y 3 × LoD en tres centros diferentes (un centro interno de QIAGEN en el Reino Unido y dos centros externos adicionales en los EE. UU.). Todas estas muestras se analizaron en cada centro en 10 días no consecutivos, utilizando equipos Rotor-Gene Q y tres usuarios para generar un total de 60 duplicados por muestra (Tabla 24).

**Tabla 24. Repetibilidad del ensayo: proporción de identificaciones correctas para las mutaciones de *PIK3CA* analizadas en muestras de ADN obtenidas de material de muestra de plasma de todos los centros**

Exón	Mutación	Nivel de mutación	Proporción fraccional de resultados válidos	Identificaciones correctas, %	IC del 95% bilateral inferior
NA	WT	C:30	223/238	93,70	89,82
7	C420R	LoD	237/238	99,58	97,68
		3 × LoD	238/238	100,00	98,46
9	E542K	LoD	237/240	98,75	96,39
		3 × LoD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD	239/240	99,58	97,70
		3 × LoD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 × LoD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	237/240	98,75	96,39
		3 × LoD	239/239	100,00	98,47
	E545K	LoD*	432/432	100,00	99,15
		3 × LoD	240/240	100,00	89,47
	Q546E	LoD	238/238	100,00	98,46
		3 × LoD	238/238	100,00	98,46
Q546R	LoD*	232/240	96,67	93,54	
	3 × LoD	240/240	100,00	98,47	
20	H1047L	LoD	236/238	99,16	97,00
		3 × LoD	238/238	100,00	98,46
	H1047R	LoD	430/432	99,54	98,34
		3 × LoD	236/236	100,00	98,45
	H1047Y	LoD	239/240	99,58	97,70
		3 × LoD	240/240	100,00	98,47

\* Tres usuarios evaluaron muestras con LoD revisado con E545K y H1047R (según la Tabla 21) durante seis días en tres centros, con dos series y cuatro duplicados con un total de 144 mediciones por centro, 432 en total en los tres centros. La Tabla 25 muestra el porcentaje de concordancia positiva (PCP) del objetivo con secuenciación de última generación (Next Generation Sequencing, NGS) como método ortogonal.

---

Se utilizó un análisis de los componentes de varianza para estimar la desviación estándar para la variabilidad de la repetibilidad y la reproducibilidad entre kits, entre series, entre usuarios, entre equipos, entre días e intraserial. En todos los componentes de varianza, la desviación estándar (DE) total fue  $\leq 1,34 \Delta C_T$  para LoD y  $\leq 0,73 \Delta C_T$  para 3 x LoD para todas las mutaciones de *PIK3CA* analizadas en las pruebas de reproducibilidad. En todos los miembros del panel de mutaciones, la DE fue  $\leq 0,20 \Delta C_T$  para LoD y  $\leq 0,10 \Delta C_T$  para 3 x LoD entre lotes (intercambiabilidad de lotes). La DE para la variabilidad (repetibilidad/precisión) intraserial varió entre 0,415  $\Delta C_T$  y 1,407  $\Delta C_T$  para LoD y entre 0,206  $\Delta C_T$  y 0,583  $\Delta C_T$  para 3 x LoD.

## Validación de tubos de recogida de sangre

El impacto del tiempo de separación de sangre a plasma en la calidad del material de muestra de plasma y en los resultados posteriores se determinó utilizando muestras de sangre artificial para H1047R (la mutación con mayor prevalencia) y se utilizó material de muestra de sangre total de voluntarios sanos como muestras nativas. Se recogió material de muestra de sangre en tubos con EDTA K<sub>2</sub> de 10 ml de cuatro donantes (ocho tubos por donante). Se generó material de muestra de plasma artificial al añadir ADN de línea celular fragmentado con mutaciones de H1047R de *PIK3CA* a tubos con sangre de dos donantes tras la extracción. El material de muestra de sangre se separó en plasma en puntos temporales de aproximadamente 1, 2, 3 y 4 horas. Se extrajo ADN de las muestras de plasma utilizando el QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit y cada objetivo se analizó con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en 16 duplicados.

Todas las muestras analizadas se identificaron correctamente en cada uno de los puntos temporales. Además, no se observó una desviación estadísticamente significativa en  $\Delta C_T$  para la muestra con mutación H1047R de *PIK3CA*.

Este estudio demostró que no se produjo un impacto del tiempo de separación de sangre a plasma, si el procesamiento se realiza dentro de un período de cuatro horas, en el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

## Exactitud: Comparación con el método de referencia analítico (material de muestra de plasma)

Para demostrar la precisión del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, se llevó a cabo un estudio con material de muestra del ensayo clínico SOLAR-1 en relación con un ensayo validado mediante NGS. Las pruebas del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y de NGS en busca de alteraciones de *PIK3CA* se realizaron utilizando el ADN de 552 unidades de material de muestra de plasma clínico del ensayo clínico SOLAR-1.

Se analizaron muestras de ADN con resultados válidos tanto con NGS como con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (542/552 muestras) para valorar el porcentaje de concordancia positiva (PCP), el porcentaje de concordancia negativa (PCN) y el porcentaje de concordancia global (PCG). En la Tabla 25, se resumen estos porcentajes, junto con los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95% bilaterales.

**Tabla 25. Análisis del grado de concordancia de las muestras de ADN obtenidas de material de muestra de plasma**

Medición	Porcentaje de concordancia (N)	Valor inferior del IC del 95%
Porcentaje de concordancia positiva	97,39 (149/153)	93,44
Porcentaje de concordancia negativa	91,26 (355/389)	88,00
Porcentaje de concordancia global	92,99 (504/542)	90,50

Para los 38 resultados discordantes del porcentaje de concordancia global:

- Cuatro muestras (0,7%) se identificaron como Wild-Type (Nativas) (es decir, No Mutation Detected [Mutación no detectada]) mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, pero se identificaron con Mutation Detected (Mutación detectada) mediante NGS.
- 34 muestras (6,3%) resultaron Mutation Detected (Mutación detectada) mediante el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, pero se identificaron como Wild-Type (Nativas) mediante NGS.
- La Tabla 26 muestra el porcentaje de concordancia positiva (PCP) del objetivo con NGS como método ortogonal.

**Tabla 26. Análisis del grado de concordancia de las muestras de ADN obtenidas de material de muestra de plasma por mutación**

Mutación*	Porcentaje de concordancia positiva (N)	IC del 95% bilateral
C420R	100,0% (2/2)	15,8; 100,0
E542K	90,9% (20/22)	70,8; 98,9
E545G	100,0% (2/2)	15,8; 100,0
E545K	100,0% (38/38)	90,7; 100,0
H1047L	100,0% (5/5)	47,8; 100,0
H1047R	97,6% (83/85)	91,8; 99,7

\* Se detectaron 6/11 mutaciones de *PIK3CA* por material de muestra de plasma en el ensayo SOLAR-1 (Tabla 31).

## Rendimiento clínico: Material de muestra de plasma

El *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit está diseñado para usarse como prueba diagnóstica con fines terapéuticos para ayudar a los médicos a identificar a pacientes con cáncer de mama que pueden ser aptos para el tratamiento con PIQRAY (alpelisib) a partir de la detección de uno o más resultados de mutaciones de *PIK3CA* en material de muestra de plasma clínico de sangre total venosa periférica anticoagulada con EDTA K<sub>2</sub>.

Se analizó de forma retrospectiva material de muestra de plasma clínico de sangre total venosa periférica anticoagulada con EDTA K<sub>2</sub> obtenido de pacientes con cáncer de mama aleatorizados en el ensayo SOLAR-1 antes del inicio del tratamiento del estudio (referencia); dicho análisis se realizó con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit para evaluar la utilidad clínica de este tipo de material de muestra para la determinación del estado de mutación de *PIK3CA* y para evaluar la concordancia entre los resultados en tejido y en plasma.

### Resultados del análisis de concordancia

La concordancia del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit al utilizar resultados de plasma con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit al utilizar resultados de tejido se muestra en la Tabla 27. De los 328 pacientes con resultados positivos en tejido con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, 179 presentaron resultados positivos en plasma con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

De los 215 pacientes con resultados negativos en tejido con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, 209 presentaron resultados negativos en plasma con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. No hubo resultados en plasma no válidos.

**Tabla 27. Tabla de correspondencias entre los resultados de tejidos del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y los resultados de plasma del *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit**

Plasma para <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Tejido para <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit			Total
	Positive (Positivo)	Negative (Negativo)	Invalid (No válido)	
Positive (Positivo)	179	6	1	186
Negative (Negativo)	149	209	5	363
Invalid (No válido)	0	0	0	0
Total	328	215	6	549

Se calculó la concordancia (PCP, PCN y PCG) entre los resultados en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y los resultados en tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit utilizando como referencia los resultados de tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (Tabla 28). Las estimaciones de PCP, PCN y PCG fueron del 55%, del 97% y del 72%, respectivamente.

**Tabla 28. Concordancia entre los resultados en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y los resultados en tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit utilizando como referencia los resultados de tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit**

Medida de concordancia	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95%*
Porcentaje de concordancia positiva	55% (179/328)	(49,0; 60,1)
Porcentaje de concordancia negativa	97% (209/215)	(94,0; 99,0)
Porcentaje de concordancia global	72% (388/543)	(67,5; 75,2)

\* IC del 95% calculado mediante el método Clopper-Pearson (exacto).

Las pruebas de confirmación de las muestras de plasma con un método de prueba de NGS de referencia validado confirmaron el 91% de los resultados en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. De los pacientes con resultados positivos en tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit que presentaron resultados negativos en

plasma con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, la NGS confirmó los resultados negativos en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit en el 80% de los casos. De los seis pacientes con resultados discordantes positivos en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y con resultados positivos en tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, cinco tuvieron confirmación de resultados positivos en plasma mediante NGS.

### Análisis de supervivencia sin progresión (SSP)

Se observó la SSP de PIQRAY (alpelisib) combinado con fulvestrant para la población con resultados positivos en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (N = 185) a favor del grupo de PIQRAY (alpelisib) más fulvestrant en comparación con el grupo de placebo más fulvestrant con una reducción estimada del 46% del riesgo de progresión de la enfermedad o de muerte (HR = 0,54; IC del 95%: 0,33; 0,88) (Tabla 29). En comparación, el HR de la SSP en la población con resultados positivos en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit fue de 0,64 (IC del 95%: 0,48; 0,85) y 0,65 (IC del 95%: 0,50; 0,85) en la cohorte de mutación de *PIK3CA* del ensayo SOLAR-1 según se determinó mediante el ensayo de tejido durante la inclusión de pacientes.

**Tabla 29. Análisis de SSP en los pacientes con resultados positivos en plasma con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit**

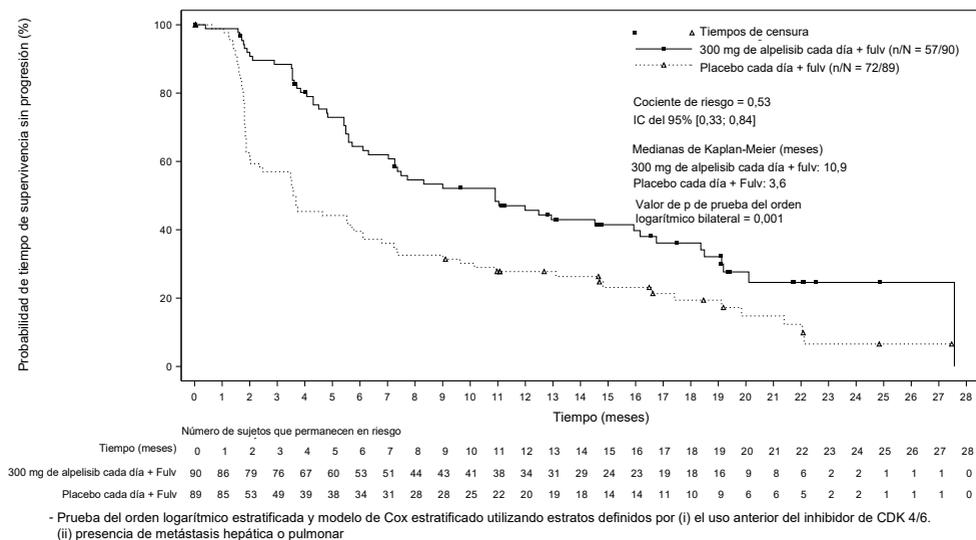
SSP (N)	HR (IC del 95%) 300 mg de PIQRAY cada día + fulv/placebo cada día + fulv*
Resultados positivos en plasma (185) obtenidos con el <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	0,54 (0,33; 0,88)

\* HR e IC del 95% calculados utilizando ajuste de enriquecimiento.

El HR de la SSP de los 179 pacientes con resultados positivos en tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit y en los pacientes con resultados positivos en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit fue de 0,53 (IC del 95%: 0,33; 0,84). La mediana de SSP fue de 10,9 meses para el grupo de PIQRAY (alpelisib) más fulvestrant frente a 3,6 meses para el grupo de placebo más fulvestrant (Tabla 30, Ilustración 21).

**Tabla 30. Supervivencia sin progresión (meses) en los pacientes con resultados positivos en tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGG PCR Kit y en los pacientes con resultados positivos en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGG PCR Kit**

Supervivencia sin progresión	300 mg de PIQRAY cada día + fulv N = 90	Placebo cada día + fulv N = 89	HR (IC del 95%)
N.º de eventos (%)	57 (63,3)	72 (80,9)	0,53 (0,33; 0,84)
PD (%)	55 (61,1)	67 (75,3)	–
Muerte (%)	2 (2,2)	5 (5,6)	–
N.º de elementos censurados (%)	33 (36,7)	17 (19,1)	–
Mediana (IC del 95%)	10,9 (7,0; 16,2)	3,6 (2,0; 5,8)	–



**Ilustración 21. Diagrama de Kaplan-Meier de la SSP por tratamiento en pacientes con resultados positivos en tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGG PCR Kit y en los pacientes con resultados positivos en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGG PCR Kit.**

**Tabla 31. Prevalencia de las mutaciones de *PIK3CA* detectadas mediante el *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* en muestras de plasma en el ensayo clínico SOLAR-1**

Exón	Mutación*	ID COSMIC†	Cambio de base	Frecuencia en material de muestra de plasma N = 186 (%)
7	C420R	757	1258 T>C	2 (1,1)
9	E542K	760	1624 G>A	22 (11,8)
	E545A	12458	1634 A>C	0 (0,0)
	E545D	765	1635 G>T	0 (0,0)
	E545G	764	1634 A>G	3 (1,6)
	E545K	763	1633 G>A	48 (25,8)
	Q546E	6147	1636 C>G	0 (0,0)
	Q546R	12459	1637 A>G	0 (0,0)
20	H1047L	776	3140 A>T	10 (5,4)
	H1047R	775	3140 A>G	102 (54,8)
	H1047Y	774	3139 C>T	0 (0,0)

\* Un paciente con resultados positivos para mutación de *PIK3CA* puede tener más de una mutación.

† COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

N = número de pacientes con resultados positivos para mutaciones de *PIK3CA* identificados por material de muestra de plasma en el ensayo SOLAR-1.

---

## Conclusiones sobre seguridad y eficacia

El estudio de precisión clínica cumplió los criterios de aceptación de PCP para las muestras con resultados positivos para mutaciones y de PCN para las muestras con resultados negativos para mutaciones, lo que confirma que el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit para plasma generó resultados precisos tanto para las muestras de uso previsto con resultados positivos y negativos para biomarcadores.

La concordancia de los resultados en plasma obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit con los resultados en tejido obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit con respecto al PCN fue del 97% y demostró un bajo riesgo de obtención de positivos falsos. Un resultado negativo falso puede evitar que un paciente tenga acceso a un fármaco posiblemente beneficioso. Se observó un PCP del 55% para plasma/tejido, lo que indica que los pacientes con resultados negativos en plasma pueden tener resultados positivos para mutaciones de *PIK3CA* en tejido. Por lo tanto, en los casos en los que se observó un resultado negativo para mutaciones de *PIK3CA* en plasma con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, se debe analizar material de muestra de tejido para confirmar el estado de mutación de *PIK3CA*.

Se demostró la eficacia clínica de PIQRAY (alpelisib) combinado con fulvestrant para la población con resultados positivos en plasma para mutación de *PIK3CA* obtenidos con el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, tal como lo ha identificado el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, con una reducción del 46% del riesgo de progresión de la enfermedad o de muerte en comparación con el placebo más fulvestrant (HR = 0,54; IC del 95%: 0,33; 0,88).

# 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) de nuestro Centro de servicio técnico: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://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](http://www.qiagen.com)).

## Comentarios y sugerencias

---

### Marcador “No C<sub>T</sub> value” (Sin valor de CT) en el Control Positivo (Positive Control, PC)

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Configuración incorrecta de la PCR   | Compruebe el esquema de pipeteo y repita la PCR.  |
| b) | Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplían las instrucciones indicadas en el apartado “Almacenamiento y manipulación de los reactivos” (página 23) | Compruebe las condiciones de almacenamiento (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario. |

### Marcador “Unexpected C<sub>T</sub> value” (Valor de CT inesperado) en NTC

Se ha producido contaminación durante la preparación de la PCR.	Asegúrese de que el área se haya descontaminado. Repita la PCR con reactivos nuevos. 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.
---	---

### Marcador “Above acceptable range” (Por encima del intervalo aceptable) o “Below acceptable range” (Por debajo del intervalo aceptable) en PC

Error durante la preparación de la PCR	Repita la PCR asegurándose de que el pipeteo sea preciso.
--	---

### Marcador “DNA input too high” (Entrada de ADN demasiado elevada) en el tubo de muestra

La concentración de la muestra es demasiado elevada	Diluya la muestra para aumentar el valor de C <sub>T</sub> . Es necesario diluir las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para la dilución [Dil.]).
---	---

## Comentarios y sugerencias

---

### Marcador “Above acceptable range” (Por encima del intervalo aceptable) en el tubo de muestra

El ADN molde inicial presente en la muestra no es suficiente

**Material de muestra de tejido:** Repita la prueba una vez más. Si el sistema vuelve a mostrar el mismo marcador, vuelva a extraer ADN utilizando dos portaobjetos del mismo material de muestra de tejido reseccionado y una cantidad adecuada de portaobjetos para CNB a fin de obtener 20 mm<sup>2</sup> y repita la PCR. Si, tras la nueva extracción, el sistema muestra el mismo marcador para el material de muestra, repita nuevamente la prueba. Si el marcador vuelve a aparecer, el material de la muestra no es apto para el uso. Se debe registrar como “indeterminada” y no se pueden realizar más pruebas.

**Material de muestra de plasma:** Repita la prueba una vez más. Si el sistema muestra el mismo marcador por segunda vez, vuelva a extraer ADN utilizando 2 ml de plasma del paciente. Si, tras la nueva extracción, el sistema muestra el mismo marcador para el material de muestra, el material de muestra no es apto para el uso, debe registrarse como “indeterminado” y no deben realizarse más pruebas. Contemple la posibilidad de repetir las pruebas con un material de muestra de plasma sanguíneo.

### Marcador “IC above acceptable range” (IC por encima del intervalo aceptable) en el tubo de muestra

Error durante la preparación de la PCR o presencia de un inhibidor en la reacción

**Material de muestra de tejido:** Repita la prueba una vez más. Si el sistema vuelve a mostrar el mismo marcador, vuelva a extraer ADN utilizando dos portaobjetos del mismo material de muestra de tejido reseccionado o una cantidad adecuada de portaobjetos para CNB a fin de obtener 20 mm<sup>2</sup> y repita la PCR. Si, tras la nueva extracción, el sistema muestra el mismo marcador para el material de muestra, repita nuevamente la prueba. Si el marcador vuelve a aparecer, el material de la muestra no es apto para el uso. Se debe informar como “indeterminada” y no se deben realizar más pruebas.

**Material de muestra de plasma:** Repita la prueba una vez más. Si el sistema muestra el mismo marcador por segunda vez, vuelva a extraer ADN utilizando 2 ml de plasma del paciente. Si, tras la nueva extracción, el sistema muestra el mismo marcador para el material de muestra, el material de muestra no es apto para el uso, debe registrarse como “indeterminado” y no deben realizarse más pruebas. Contemple la posibilidad de repetir las pruebas con un material de muestra de plasma sanguíneo.

## Comentarios y sugerencias

---

### Marcador “No C<sub>t</sub> value” (Sin valor de CT) en el control T1 (muestra)

La muestra no contiene ADN molde amplificable

**Material de muestra de tejido:** Repita la prueba una vez más. Si el sistema vuelve a mostrar el mismo marcador, vuelva a extraer ADN utilizando dos portaobjetos del mismo material de muestra de tejido reseccionado o una cantidad adecuada de portaobjetos para CNB a fin de obtener 20 mm<sup>2</sup> y repita la PCR. Si, tras la nueva extracción, el sistema muestra el mismo marcador para el material de muestra, repita nuevamente la prueba. Si el marcador vuelve a aparecer, el material de la muestra no es apto para el uso. Se debe registrar como “indeterminada” y no se pueden realizar más pruebas.

**Material de muestra de plasma:** Repita la prueba una vez más. Si el sistema muestra el mismo marcador por segunda vez, vuelva a extraer ADN utilizando 2 ml de plasma del paciente. Si, tras la nueva extracción, el sistema muestra el mismo marcador para el material de muestra, el material de muestra no es apto para el uso, debe registrarse como “indeterminado” y no deben realizarse más pruebas. Contemple la posibilidad de repetir las pruebas con un material de muestra de plasma sanguíneo.

---

# Referencias

1. Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., et al. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17, 615.
2. Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., et al. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 304, 554.
3. Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 490, 61.
4. National Breast Cancer Foundation (2018). Breast cancer facts. Available at: [www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-facts](http://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-facts). Accessed: 14 January 2019.
5. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* 68, 7.
6. Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., et al. (2018). European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 29, 1016.

# Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visite nuestro Centro de servicio técnico en el sitio [www.qiagen.com/Support](http://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](http://www.qiagen.com)).

# Símbolos

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

Símbolo	Definición del símbolo
	Marcado de conformidad europea
	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material
	Componentes
	Contenido
	Número
	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

**Símbolo****Definición del símbolo**

---



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso



Precaución

# Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de catálogo
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: 6 mezclas de reacción, control positivo, ADN polimerasa <i>Taq</i> , agua para NTC y agua para dilución de muestras	873111
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: columnas QIAamp MinElute®, proteinasa K, tampones y tubos de recogida (2 ml)	60404
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit		
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: columnas QIAamp MinElute, proteinasa K, tampones y tubos de recogida (2 ml)	61504
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para real-time PCR y analizador de disociación de alta resolución 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

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para real-time PCR y analizador de fusión de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tubos de pared fina para 1000 reacciones de 20-50 µl	981005
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapas para 10 000 reacciones	981106
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para preparación manual de reacciones con una pipeta monocal en 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes	Bloque de aluminio para la configuración de reacción manual con pipeta de un solo canal en tubos de PCR de 96 x 0,2 ml	9018905
72-Well Rotor	Para almacenar Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, con volúmenes de reacción de 10-50 µl; requiere el Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Para fijar Strip Tubes and Caps, 0.1 ml en el 72-Well Rotor	9018904
Colector de vacóps QIAvac 24 Plus	Para purificación del ADNtc	19413

QIAvac Connecting System	Para purificación del ADNtc	19419
Vacuum Pump	Para la purificación del ADNtc; o bomba equivalente que pueda producir un vacío de -800 a -900 mbar	84010

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual 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](http://www.qiagen.com) o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

## Historial de revisiones del documento

<b>Fecha</b>	<b>Modificaciones</b>
R1, junio de 2019	Versión inicial
R2, septiembre de 2019	Corrección en la columna Frequency (Frecuencia) en Tabla 15; Corrección de errores tipográficos; Actualizaciones de diseño

---

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

#### Acuerdo de licencia limitada para el *therascreen* PIK3CA RGG 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](http://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.

Aviso al comprador: La compra de este producto otorga al comprador el derecho limitado e intransferible de utilizar solo esta cantidad del producto para llevar a cabo el proceso patentado de ácido nucleico peptídico (Peptide Nucleic Acid, PNA) solamente para las actividades de la compra tal como se establece en el manual de instrucciones o el prospecto de QIAGEN adjuntos, dentro del cambio del diagnóstico humano. Al comprar este producto, el comprador acepta no hacer lo siguiente: (1) revender el producto de ninguna forma; (2) utilizar el producto para aplicaciones forenses o (3) utilizar el producto para fines diferentes de los indicados en esta Licencia de etiqueta de uso limitado. Puede obtener información adicional sobre la adquisición de derechos derivados de las patentes propiedad de Applied Biosystems LLC poniéndose en contacto con el departamento Licensing Department de Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008; teléfono (760) 603-7200; correo electrónico [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com).

Para consultar los términos actualizados de la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, *therascreen*® (Grupo QIAGEN); DNAzap™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.); PIQRAY® (Novartis AG). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley.

1116336 Sep-19 HB-2635-001 © 2019 QIAGEN, todos los derechos reservados.

---

Pedidos [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Servicio técnico [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Sitio web [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)