

Noviembre de 2019

Instrucciones de uso de *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit (manual)



Versión 1



Diagnóstico in vitro cualitativo

Para su uso con el equipo Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA



1119793ES

Contenido

Tecnologías de QIAGEN para muestras y ensayos	5
Uso previsto	6
Resumen y explicación	7
Principio del procedimiento	8
Materiales suministrados	12
Contenido del kit.....	12
Materiales requeridos pero no suministrados	13
Advertencias y precauciones.....	15
Información de seguridad.....	15
Precauciones generales.....	15
Almacenamiento y manipulación de reactivos.....	17
Obtención y preparación de materiales de muestras para el análisis y almacenamiento de los mismos	18
Procedimiento	20
Extracción de ADN.....	20
Protocolo: valoración de las muestras de ADN.....	22
Protocolo: detección de las mutaciones de KRAS.....	35
Interpretación de los resultados	47
Guía para la resolución de problemas	49
Indicadores generados por el software <i>therascreen</i> KRAS Assay Package.....	50
Control de calidad.....	54
Limitaciones	54
Características de rendimiento	55

Rendimiento analítico.....	55
Punto de corte.....	55
Límite de blanco.....	56
Comparación con el método de referencia analítico: CRC.....	56
Comparación con el método de referencia analítico: NSCLC.....	59
Límite de detección (Limit of Detection, LoD).....	61
Introducción de ADN y linealidad.....	63
Sustancias interferentes.....	67
Contaminación cruzada.....	68
Exclusividad/reactividad cruzada.....	69
Repetibilidad y reproducibilidad.....	72
Variabilidad en la manipulación de muestras.....	74
Equivalencia de los métodos de adquisición de muestras (solamente NSCLC).....	76
Referencias.....	77
Símbolos.....	80
Información de contacto.....	81
Apéndice 1: protocolo manual del <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit.....	82
Interpretación de los resultados (manual).....	99
Configuración del análisis del software.....	99
Análisis de los datos de valoración de las muestras.....	100
Análisis de la muestra.....	103
Apéndice 2: instalación del software <i>therascreen</i> KRAS Assay Package.....	109
Información para pedidos.....	113
Historial de revisiones del documento.....	115

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN define los estándares en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas.
- Investigación con microARN y ARNi.
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para obtener más información, visite www.qiagen.com.

Uso previsto

El *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit es un ensayo cualitativo de real-time PCR para la detección de 7 mutaciones somáticas en los codones 12 y 13 del oncogén KRAS humano mediante el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. El kit se ha diseñado para su uso con ADN extraído de muestras de tejido fijado en formalina e impregnado en parafina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) de cáncer colorrectal (Colorectal Cancer, CRC) o cáncer de pulmón no microcítico (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) obtenidas mediante resección, punción biópsica con aguja gruesa (Core Needle Biopsy, CNB) o aspiración con aguja fina (Fine Needle Aspiration, FNA).

Las mutaciones somáticas en el gen KRAS se consideran posibles biomarcadores predictivos de la resistencia al factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) humano en terapias dirigidas como las basadas en panitumumab y cetuximab para el tratamiento del CRC. Asimismo, las mutaciones somáticas en el gen KRAS también pueden señalarse como un posible biomarcador predictivo para la toma de decisiones de tratamiento en determinadas terapias del NSCLC.

El médico valorará el estado de la mutación en el paciente, además de otros factores relativos a la enfermedad, para tomar una decisión sobre la terapia. Ninguna decisión relativa a la aplicación de tratamientos en pacientes con cáncer debe basarse exclusivamente en el estado de la mutación en el gen KRAS.

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit no tiene como objetivo servir de prueba diagnóstica del CRC, el NSCLC ni de ninguna otra enfermedad.

Resumen y explicación

Los cánceres humanos (1-4) suelen presentar mutaciones en el oncogén KRAS. Gracias a las tecnologías Scorpions® y ARMS® (Allele Refractory Mutation System) (5, 6), el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit permite la detección de 7 mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogén KRAS en ADN genómico nativo (tabla 1). Según los datos de la base de datos COSMIC (2015 v72), las 7 mutaciones detectadas con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit suponen >95 % de todas las mutaciones KRAS conocidas en pacientes con CRC y >88 % de todas las mutaciones conocidas en pacientes con NSCLC (7).

Tabla 1. Lista de mutaciones e identificadores COSMIC

Mutación	Cambio de base	ID COSMIC*
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

* Se utilizan los ID COSMIC del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (*Catalog of Somatic Mutations in Cancer*) (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

La prueba presenta un elevado nivel de especificidad y sensibilidad, lo que permite detectar un porcentaje bajo de ADN mutado en un fondo de ADN nativo. Siempre que haya copias suficientes de ADN, es posible detectar un 0,8 % de mutaciones en un fondo de ADN genómico nativo (consulte el apartado “Características de rendimiento”, en la página 55, para conocer la información sobre los límites de detección de cada mutación).

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se utiliza con el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). El beneficio de este kit es su elevada especificidad para detectar la diana, su rapidez y eficacia y la objetividad en la determinación de los resultados.

Principio del procedimiento

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit combina 2 tecnologías (ARMS y Scorpions) para detectar mutaciones de real-time PCR.

Mezclas para reacción de mutación

Cada mezcla para reacción utiliza un primer ARMS específico para la mutación que amplifica selectivamente el ADN mutado y un primer Scorpions para la detección del producto de la amplificación.

ARMS

La amplificación específica de alelos se lleva a cabo mediante la tecnología ARMS, que utiliza la enzima *Taq* ADN polimerasa para diferenciar entre una coincidencia y un error de coincidencia de base en el extremo 3' de un primer 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.

Scorpions

La detección de la amplificación se realiza mediante la tecnología Scorpions. La tecnología Scorpions utiliza moléculas bifuncionales que contienen un primer de PCR unido covalentemente a una sonda. La sonda incorpora el fluoróforo carboxifluoresceína (FAM™) y un quencher o supresor. Este último se encarga de silenciar la fluorescencia del fluoróforo. Cuando la sonda se une al amplicón ARMS durante la PCR, el fluoróforo y el supresor se separan y se produce un aumento detectable de la fluorescencia.

Formato del kit

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contiene 8 ensayos:

- 1 ensayo de control (mezcla de reacción para control [CTRL])
- 7 ensayos de mutación (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Las mezclas de reacción son dobles y contienen reactivos marcados con FAM para la detección de dianas y un control interno marcado con HEX™. Las mezclas de reacción y los reactivos de control positivos contienen tampón Tris EDTA, mientras que el control positivo contiene el ARN transportador Poly A.

Ensayos

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit incluye un procedimiento de 2 pasos. En el primer paso, el ensayo de control se realiza para evaluar el ADN total amplificable de KRAS de una muestra. En el segundo paso, tanto la mutación como los ensayos de control se realizan para determinar la presencia o ausencia de ADN mutante.

Reacción para el control

La CTRL utiliza un primer Scorpions y un primer sin marcar para la amplificación de una secuencia breve del exón 4 del gen KRAS. La reacción para el 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.

Ensayo de control

El ensayo de control, marcado con FAM, sirve para valorar el ADN total amplificable de KRAS de la muestra. El ensayo de control amplifica una región del exón 4 del gen KRAS. Los primers y la sonda Scorpions están diseñados para realizar la amplificación independientemente de los polimorfismos conocidos del gen KRAS.

Ensayos de mutación

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

Controles

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

Control interno

Cada mezcla de reacción contiene un control interno, además de la reacción diana. Un error indica que pueden existir inhibidores que podrían derivar en un resultado inexacto o bien que se ha producido un error de configuración del usuario para ese tubo. Si el fallo del control interno viene dado por la inhibición de la PCR, diluir la muestra puede reducir el efecto de los inhibidores. Sin embargo, cabe destacar que esta acción también diluye el ADN diana. El kit incluye un tubo de agua para la dilución de la muestra (Dil.). La dilución de muestras debe realizarse con el agua para la dilución de muestras (Dil.).

Control positivo

Cada serie debe contener un control positivo en los tubos del 1 al 5. El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contiene un control positivo (Positive Control, PC) de KRAS que sirve como molde en la reacción de control positivo. Se evaluarán los resultados de control positivo para garantizar que el kit funciona según los criterios de aceptación indicados.

Control negativo

Cada serie debe contener un control negativo ("control sin molde") en los tubos del 9 al 13. El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contiene agua para el control sin molde (No Template Control, NTC), que se utiliza como "molde" en el control sin molde. El control sin molde se utiliza para evaluar las posibles contaminaciones durante la configuración de la serie y para evaluar el rendimiento de la reacción de control interno.

Valoración de las muestras

La mezcla de reacción para control (CTRL) suministrada con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se utiliza para valorar el ADN total amplificable de KRAS de una muestra. El ensayo de control amplifica una región del exón 4 del gen KRAS. Se recomienda preparar las muestras únicamente con el ensayo de control usando el control positivo (Positive Control, PC) de KRAS como control positivo y agua para el NTC como control sin molde.

Plataforma y software

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit está diseñado específicamente para utilizarse con el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. El software Rotor-Gene Q y el software *therascreen* KRAS Assay Package se encuentran disponibles para la descarga por Internet o por separado en CD.

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

Consulte Apéndice 2: instalación del software *therascreen* KRAS Assay Package para ver las instrucciones de instalación.

Materiales suministrados

Contenido del kit

therascreen KRAS RGQ PCR Kit			(24)
N.º de catálogo		Identificación de tubos	874011
Número de preparaciones			24
Color	Identidad		Volumen
Rojo	Control Reaction Mix (mezcla de reacción para control)	1 CTRL	2 x 600 µl
Morado	12ALA Reaction Mix (mezcla de reacción para 12ALA)	2 12ALA	600 µl
Naranja	12ASP Reaction Mix (mezcla de reacción para 12ASP)	3 12ASP	600 µl
Rosa	12ARG Reaction Mix (mezcla de reacción para 12ARG)	4 12ARG	600 µl
Verde	12CYS Reaction Mix (mezcla de reacción para 12CYS)	5 12CYS	600 µl
Amarillo	12SER Reaction Mix (mezcla de reacción para 12SER)	6 12SER	600 µl
Gris	12VAL Reaction Mix (mezcla de reacción para 12VAL)	7 12VAL	600 µl
Azul	13ASP Reaction Mix (mezcla de reacción para 13ASP)	8 13ASP	600 µl
Beis	KRAS Positive Control (control positivo de KRAS)	9 PC	250 µl
Menta	Taq DNA Polymerase (ADN polimerasa Taq)	Taq	80 µl
Blanco	Water for NTC (agua para el control sin molde)	NTC	1,9 ml
Blanco	Water for Sample Dilution (agua para la dilución de la muestra)	Dil.	1,9 ml
<i>Manual de theascreen KRAS RGQ PCR Kit (manual de uso en inglés)</i>			1

Materiales requeridos pero no suministrados

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

Reactivos

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (n.º de referencia 56404; consulte el apartado Extracción de ADN)
- Xileno
- Etanol (96-100 %)*

Consumibles

- Puntas de pipeta estériles con filtros (para evitar la contaminación cruzada, recomendamos puntas de pipeta con barreras para aerosoles)
- Tubos estériles de microcentrífuga para la preparación de las mezclas maestras
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps para uso con un 72-Well Rotor (n.º de referencia 981103 o 981106)

Equipo

- Equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM con canales de fluorescencia para Cycling Green y Cycling Yellow (detección de FAM y HEX, respectivamente)
- Software Rotor-Gene Q, versión 2.3 con software KRAS Assay Package (versión 3.1.1) instalado para la detección de mutaciones automatizada (consulte el apartado Apéndice 2: instalación del software *therascreen* KRAS Assay Package).

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

Nota: El software Rotor-Gene Q se puede utilizar sin el software KRAS Assay Package para la detección manual de mutaciones. Consulte Apéndice 1: protocolo manual del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

- Agitador calentador*, incubador orbital térmico, bloque térmico o baño de agua que permita la incubación a 56 °C y 90 °C
- Centrífuga de mesa† con rotor para tubos de 1,5 ml
- Agitador vórtex de mesa†
- 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*

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

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

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico in vitro

Información de seguridad

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

Precauciones generales

El usuario debe tener en cuenta siempre las siguientes indicaciones:

- Almacene y extraiga el material positivo (materiales de muestras y controles positivos) por separado del resto de reactivos y añádalo a la mezcla de reacción en una zona separada físicamente.
- Extreme la precaución para evitar la contaminación de las reacciones de PCR con material de control sintético. Es recomendable usar pipetas específicas independientes para preparar las mezclas de reacción y añadir ADN molde. La preparación y dispensación de las mezclas de reacción deben realizarse en una zona separada de la zona donde se añade el molde. Los tubos de Rotor-Gene Q no se deben abrir después de haber finalizado la serie PCR. Con ello, se evita la contaminación del laboratorio con productos posteriores a la PCR.
- Los reactivos del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit presentan una dilución óptima. No se recomienda una mayor dilución de los reactivos puesto que estos podrían perder eficacia. No se recomienda utilizar volúmenes de reacción inferiores a 25 µl, puesto que se incrementaría el riesgo de resultados falsos negativos.

-
- Todos los reactivos del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se han formulado específicamente para obtener un rendimiento óptimo. Todos los reactivos suministrados con el kit se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Para mantener un rendimiento óptimo de los reactivos del kit, no los sustituya.
 - Utilice únicamente la *Taq* ADN polimerasa (*Taq*) suministrada con el kit. No la sustituya por *Taq* ADN polimerasa de otros kits del mismo o de otro tipo ni por *Taq* ADN polimerasa de otro fabricante.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se suministra en hielo seco. Si alguno de los componentes del *therascreen* KRAS 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, el manual o los reactivos, póngase en contacto con los departamentos del servicio técnico de QIAGEN (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Tras recibirlo, debe almacenar el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit inmediatamente en un congelador a una temperatura constante de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y protegerlo de la luz. Al igual que todas las moléculas marcadas con fluorescencia, los primers Scorpions deben protegerse de la luz para evitar el blanqueamiento y la pérdida de rendimiento.

Si se almacena en las condiciones recomendadas en el embalaje original, el kit *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada. No es aconsejable descongelarlo y volver luego a congelarlo. No exceda el máximo de 6 ciclos de congelación-descongelación.

Obtención y preparación de materiales de muestras para el análisis y almacenamiento de los mismos

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

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

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

Preparación de muestras de tejido

Nota: 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 deposítelos en tubos de microcentrífuga con un bisturí nuevo para cada muestra.

Preparación de las muestras de tejido para la extracción del ADN (CRC)

- Con los materiales y métodos estándares, fije el material de muestra de tejido en formalina con tampón neutral (Neutral Buffered Formalin, NBF) al 10 % e incluya el material de muestra de tejido en parafina. Con un microtomo, corte secciones en serie de 5 μm del bloque de parafina y colóquelas en portaobjetos de vidrio.
- Recurra a un profesional cualificado (p. ej., un patólogo) para valorar la sección teñida con hematoxilina-eosina (H&E) y determinar el contenido del tumor y el área. Marque el portaobjetos teñido para diferenciar el tumor del tejido normal. Utilice secciones en serie para realizar la extracción de ADN.

- Utilice secciones con >20 % de contenido tumoral por área para el procesamiento sin macrodissección (véase más abajo).
- En el caso de secciones con <20 % de contenido tumoral por área, macrodisseccione una o más secciones. Descarte el tejido no tumoral.
- Para las secciones con <4 mm² por área, procese dos o más secciones para aumentar el área tumoral total a un mínimo de 4 mm² (válido también para muestras con y sin macrodissección). Descarte el tejido no tumoral.
- Raspe el exceso de parafina localizado alrededor del tejido mediante un bisturí estéril nuevo.

Preparación de las muestras de tejido para la extracción del ADN (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)

- Con los materiales y métodos estándares, fije el material de muestra de tejido en formalina con tampón neutral (Neutral Buffered Formalin, NBF) al 10 % e incluya el material de muestra de tejido en parafina. Con un microtomo, corte secciones en serie de 5 µm del bloque de parafina y colóquelas en portaobjetos de vidrio.
- Recorra a un profesional cualificado (p. ej., un patólogo) para valorar la sección teñida con H&E y determinar la presencia de un tumor. Utilice secciones en serie para realizar la extracción de ADN.
- Raspe el exceso de parafina localizado alrededor del tejido mediante un bisturí estéril nuevo.

Almacenamiento

Conserve los bloques FFPE y portaobjetos a temperatura ambiente. Los portaobjetos pueden conservarse a temperatura ambiente durante un máximo de 4 semanas antes de la extracción del ADN.

El ADN genómico puede conservarse a 2-8 °C durante 1 semana con posterioridad a la extracción y, luego, a una temperatura comprendida entre -25 y -15 °C durante hasta 8 semanas antes de su uso.

Procedimiento

Extracción de ADN

Las características de rendimiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se determinaron mediante ADN extraído con el QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (n.º de referencia 56404). Si se utiliza el QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, lleve a cabo la extracción del ADN de acuerdo con las instrucciones del manual y tenga en cuenta las recomendaciones siguientes.

Extracción de ADN (muestras de CRC)

- El QIAamp DNA FFPE Tissue Kit solamente debe utilizarse de modo manual.
- No utilice el paso de ribonucleasa que se describe en el manual del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- No utilice la QIAGEN Deparaffinization Solution. Utilice solamente el método xileno/etanol para desparafinización descrito en el manual del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- La digestión de la proteinasa K (paso 11 del manual del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) debe realizarse durante 1 hora.
- Las muestras deben eluirse con 200 µl de tampón de elución (Buffer ATE) del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Extracción de ADN (muestras de NSCLC)

- Utilice secciones de 2 x 5 µm por extracción.
- El QIAamp DNA FFPE Tissue Kit solamente debe utilizarse de modo manual.
- No utilice el paso de ribonucleasa que se describe en el manual del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- No utilice la QIAGEN Deparaffinization Solution incluida en el QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Utilice solamente el método xileno/etanol para desparafinización descrito en el manual del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- La digestión de la proteinasa K (paso 11 del manual del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) debe realizarse durante 1 hora.
- Añada 60 µl de tampón de elución (ATE) del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit e incube durante 2,5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugue a velocidad máxima durante 1 minuto.
- Añada otros 60 µl de tampón de elución (ATE) del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit e incube durante 2,5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugue a velocidad máxima durante 1 minuto.

Protocolo: valoración de las muestras de ADN

Este protocolo se utiliza para valorar el ADN amplificable total de las muestras mediante KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) para la valoración de muestras automatizada.

Nota: Para obtener información sobre la valoración manual de las muestras, consulte el apartado Apéndice 1: protocolo manual del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Pueden evaluarse hasta 24 muestras mediante la CTRL disponible.
- Utilice la CTRL para valorar el ADN antes de realizar el análisis.

Nota: Es importante utilizar la CTRL tal como se describe más abajo para realizar la valoración, en lugar de los métodos de espectrofotometría u otros métodos alternativos. Es posible que no pueda amplificarse el ADN muy degradado, incluso si los primers generan fragmentos cortos de ADN.

- Para garantizar un uso eficiente de los reactivos del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, agrupe las muestras de ADN en lotes en la medida de lo posible para obtener series analíticas completas. Analizar las muestras de forma individual o por grupos más reducidos supone un mayor consumo de reactivos y reduce el número total de muestras que se pueden analizar con un único *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Compruebe que se haya instalado el software *therascreen* KRAS Assay Package correcto correspondiente a la versión del software Rotor-Gene Q antes de utilizar el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM por primera vez (consulte el apartado Apéndice 2: instalación del software *therascreen* KRAS Assay Package).

Procedimiento

1. Descongele por completo la mezcla de reacción para control (tubo para CTRL), el agua exenta de nucleasas para el control sin molde (No Template Control, NTC) y el control positivo (Positive Control, PC) de KRAS a temperatura ambiente (15-30 °C) durante al menos 1 hora.

Nota: Descongele la enzima Taq ADN polimerasa (Taq) a temperatura ambiente (15-30 °C) a la vez que los otros reactivos (consulte el apartado Almacenamiento y manipulación de reactivos). Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

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

Nota: Realice una configuración de la PCR a temperatura ambiente.

Tabla 2. Tiempo de descongelación, tiempos de configuración de la PCR y temperaturas de almacenamiento

Tiempo de descongelación		Temp. almac.* posterior a config. de PCR	Tiempo máximo config. de PCR y almacenamiento
Mínimo	Máximo		
1 hora	4,5 horas	Temperatura ambiente (15-30 °C)	7 horas
1 hora	4,5 horas	2-8 °C	18 horas

* Por almacenamiento se entiende el tiempo transcurrido entre la finalización de la configuración de la PCR y el inicio de la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

2. Mezcle los reactivos descongelados invirtiendo cada tubo 10 veces para evitar concentraciones localizadas de sales. A continuación, centrifúguelos brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo.

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

3. Prepare cantidades suficientes de mezclas maestras (mezcla de reacción para control [CTRL] más la enzima Taq ADN polimerasa [Taq]) según los volúmenes indicados en la tabla 3 para:
 - Todas las muestras de ADN
 - 1 reacción de control positivo (Positive Control, PC) para KRAS

- 1 reacción de agua exenta de nucleasas para el control sin molde (No Template Control, NTC)
- 1 muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR

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

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

Componente	Volumen
Mezcla de reacción para control (CTRL)	19,76 μl x (n + 1)*
<i>Taq</i> ADN polimerasa (<i>Taq</i>)	0,24 μl x (n + 1)*
Volumen total	20 μl /reacción

* n = número de reacciones (muestras y controles).

Prepare volumen suficiente de mezcla maestra para una muestra adicional (n + 1) a fin de asegurar suficiente excedente para la configuración de la PCR.

El valor n no debería ser superior a 24 (más los controles), puesto que 24 es el número máximo de muestras por serie analítica.

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

Nota: Pipetee la enzima *Taq* ADN polimerasa. Para ello, introduzca con cuidado la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra de enzima en exceso.

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

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

Tabla 4. Esquema de la serie analítica en el bloque de carga para la valoración de las muestras de ADN

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

* Los números indican la posición en el bloque de carga y la posición final del rotor.

5. Utilice una pipeta con un volumen inferior al volumen total de la mezcla maestra de reacción y mezcle bien aspirando y eyectando 10 veces con la pipeta.

6. Añada inmediatamente 20 µl de la mezcla maestra en cada tubo en tiras para PCR.

Nota: Consulte la tabla 4 para conocer el esquema de tubos. Para llevar a cabo la valoración de las muestras de ADN, la mezcla maestra para el ensayo de control debe añadirse a un tubo para PC, a un tubo para NTC y a un tubo para cada muestra de ADN.

7. Añada inmediatamente 5 µl de agua exenta de nucleasas para el control sin molde (No Template Control, NTC) al tubo de NTC (posición 2) y tápelo.

8. Añada 5 µl de cada muestra de ADN a los tubos de muestras (posiciones de tubos 3 a 26) y tápelos.

9. Añada 5 µl de control positivo (Positive Control, PC) para KRAS al tubo de PC (posición 1) y tápelo.

Cada tubo debería contener un volumen de reacción total de 25 µl (20 µl de la mezcla maestra preparada en la tabla 3 más 5 µl de NTC/muestra/PC).

10. Con un rotulador permanente, marque las tapas de los primeros tubos en la posición numérica más baja 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.
11. Invierta 4 veces los tubos tapados para mezclar la muestra y la mezcla de reacción.
12. Con ayuda de las marcas de orientación, 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 analítica (tabla 4).

Nota: Si el rotor no está totalmente lleno, deben ocuparse todas las posiciones no utilizadas con tubos vacíos tapados. De este modo, se garantiza la eficiencia térmica del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
13. 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.
14. Inicie el software Rotor-Gene Q. Para ello, haga doble clic en el icono theascreen KRAS QC Locked Template (Molde bloqueado de CC de KRAS de theascreen) del escritorio del ordenador portátil conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (figura 1).



Figura 1. Icono "therascreen KRAS QC Locked Template" (Molde bloqueado de CC de KRAS de theascreen).

La pestaña “Setup” (Configuración) se abre de manera predeterminada (figura 2).

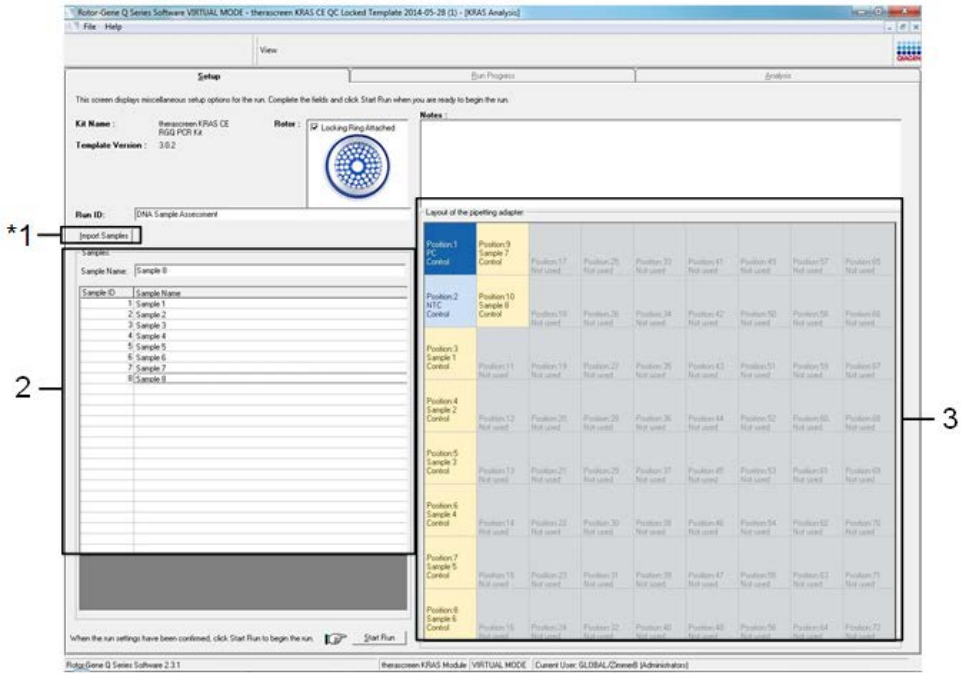


Figura 2. Pestaña “Setup” (Configuración) y casilla “Locking Ring Attached” (Anillo de fijación sujeto). 1 = pestaña “Setup” (Configuración), 2 = casilla “Locking Ring Attached” (Anillo de fijación sujeto).

15. Asegúrese de que el anillo de fijación esté sujeto correctamente y marque la casilla “Locking Ring Attached” (Anillo de fijación sujeto). Cierre la tapa del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
16. Introduzca el identificador de la serie en el cuadro de diálogo Run ID (Identificador de la serie) de acuerdo con la convención de nomenclatura local. Escriba el nombre de la muestra en el cuadro de diálogo Sample Name (Nombre de la muestra) según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Intro.

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

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

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

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

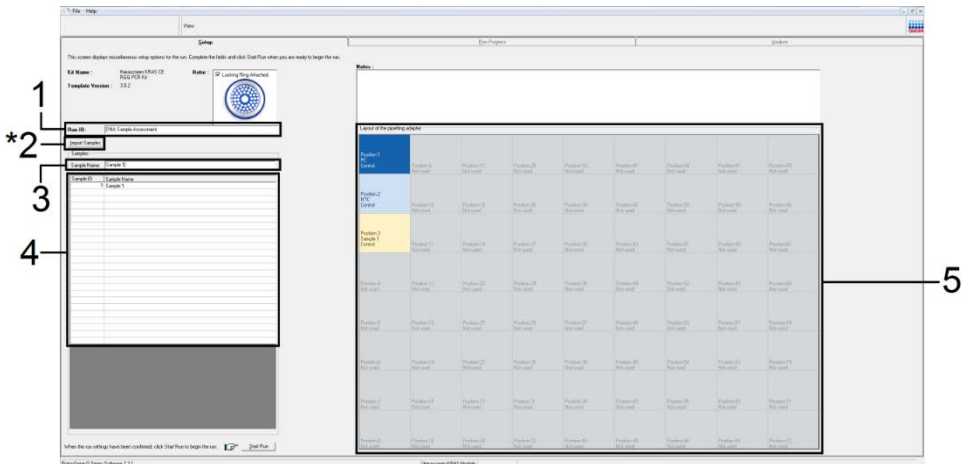


Figura 3. Introducción del "Run ID" (Identificador de la serie) y del "Sample Name" (Nombre de la muestra). 1 = cuadro de diálogo "Run ID" (Identificador de la serie), 2 = botón "Import Samples" (Importar muestras), 3 = cuadro de diálogo "Sample Name" (Nombre de la muestra), 4 = Lista de muestras, 5 = panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo).

17. Repita el paso 16 para introducir los nombres de todas las muestras adicionales (figura 4).
 Nota: Para editar el nombre de una muestra, haga clic en la opción "Sample Name" (Nombre de la muestra) de la lista de muestras para que la muestra seleccionada aparezca en el cuadro de diálogo "Sample Name" (Nombre de la muestra) anterior. Edite el nombre de la muestra según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Intro para actualizar el nombre.

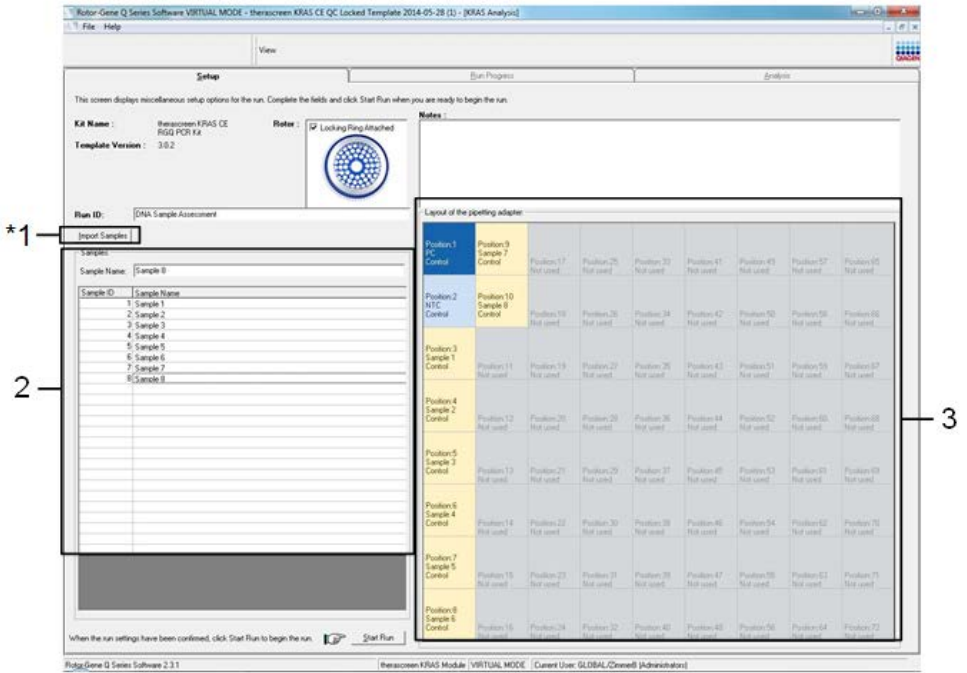


Figura 4. Introducción de nombres de muestra adicionales en el campo de diálogo "Sample Name" (Nombre de la muestra). *1 = botón "Import Samples" (Importar muestras), 2 = campo de diálogo "Sample Name" (Nombre de la muestra) y lista de muestras, 3 = panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo) con nombres de muestra adicionales.

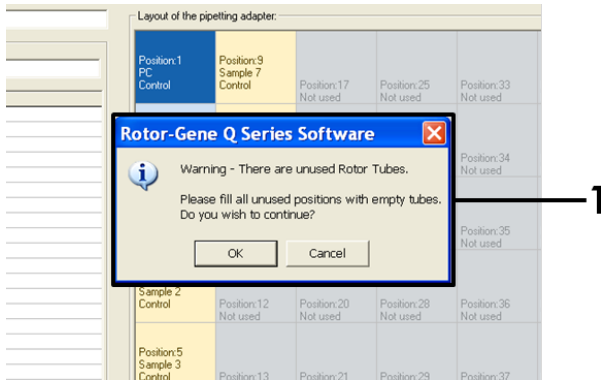


Figura 6. 1 = Mensaje “Warning” (Advertencia) sobre las posiciones sin utilizar del rotor.

19. Aparecerá la ventana “Save As” (Guardar como). Seleccione un nombre de archivo adecuado y guarde la serie de PCR como un archivo de ejecución *.rex en la ubicación seleccionada. Haga clic en Save (Guardar) (figura 7).

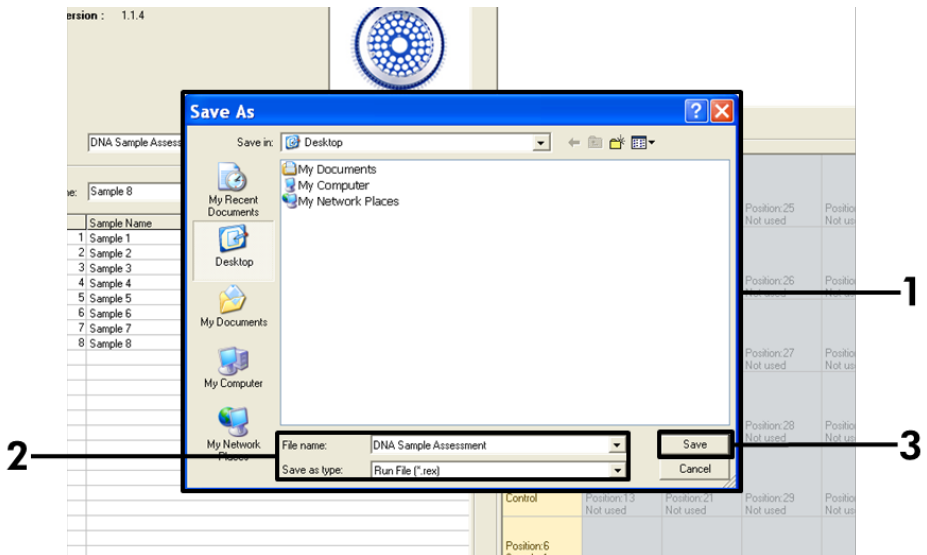


Figura 7. Guardado del archivo de ejecución. 1 = ventana “Save As” (Guardar como), 2 = nombre del archivo y guardar como tipo de archivo *.rex, 3 = botón “Save” (Guardar).

Comienza la serie de PCR.

Nota: Cuando empieza la serie, la pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie) se abre automáticamente para mostrar el registro de la temperatura y el tiempo restante para finalizar la serie (figura 8).

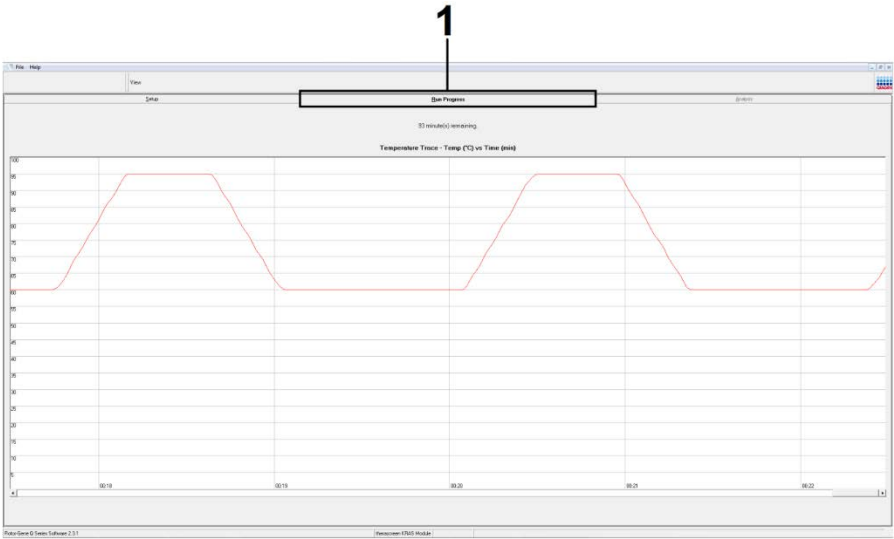


Figura 8. Pestaña Run Progress (Progreso de la serie).

Una vez finalizada la serie, se abre automáticamente la pestaña "Analysis" (Análisis).

Nota: Si la pestaña "Analysis" (Análisis) no se abre, haga clic en la pestaña "Analysis" (Análisis) (figura 9).

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

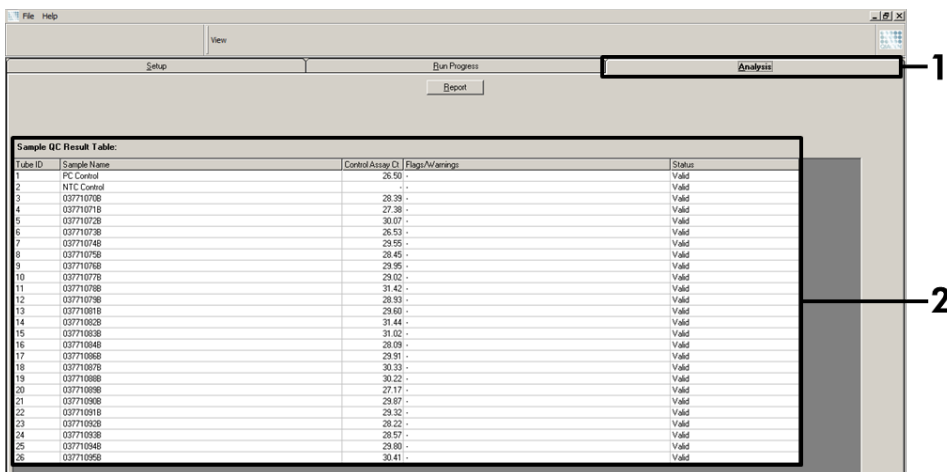


Figura 9. Pestaña “Analysis” (Análisis) e informe de los resultados. 1 = pestaña “Analysis” (Análisis), 2 = “Sample QC Result Table” (Tabla de resultados de CC de la muestra).

Nota: Los resultados de control se presentan de la siguiente manera en la tabla “Sample QC Result Table” (Tabla de resultados de CC de la muestra) (2 en la figura 9).

- Controles de la serie (PC y NTC, posiciones 1 y 2 de tubos respectivamente): se muestra el valor “Valid” (Válido) si los resultados se encuentran dentro de los intervalos aceptables. De lo contrario, se indicará “Invalid” (No válido).
- Valor de C_T de la reacción de control de la muestra $>32,00$: se muestra el valor “Invalid” (No válido). La cantidad de ADN no es suficiente para realizar el análisis de la mutación. Es necesario volver a analizar la muestra. Si la cantidad de ADN sigue siendo insuficiente, extraiga más tejido tumoral si es posible (consulte el apartado “Guía para la resolución de problemas”).
- Valor de C_T de la reacción de control de la muestra $<21,92$: se muestra el valor “Invalid” (No válido). La concentración de ADN es demasiado alta para realizar el análisis de la mutación. Diluya la muestra con agua exenta de nucleasas para dilución (Dil.) y repita el análisis. Diluya hasta obtener un valor de C_T que se encuentre en el intervalo 21,92-32,00. Una dilución 1:1 aumenta el valor de C_T en aproximadamente 1,0.

- Valor de C_T de la reacción de control de la muestra de 21,92-32,00 ($21,92 \leq C_T$ de control $\leq 32,00$): se muestra el valor "Valid" (Válido); la concentración de ADN es adecuada para realizar el análisis de mutación.

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

20. Para generar los archivos de informe, haga clic en Report (Informe). Aparecerá la ventana "Report Browser" (Explorador de informes). En el apartado "Templates" (Moldes), seleccione KRAS Analysis Report (Informe del análisis de KRAS) y, luego, haga clic en Show (Mostrar) (figura 10).

Nota: Existe la posibilidad de guardar los informes en otra ubicación en formato de archivo Web si se hace clic en el botón Save As (Guardar como) situado en la esquina superior izquierda de cada informe.

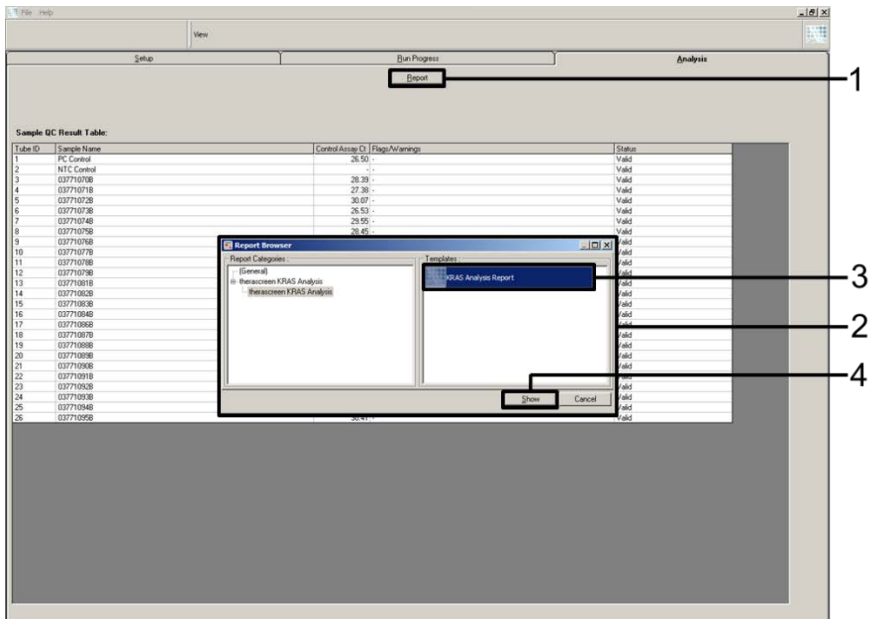


Figura 10. Selección de "KRAS Analysis Report" (Informe del análisis de KRAS). 1 = "Report" (Informe), 2 = ventana "Report Browser" (Explorador de informes), 3 = selección de "KRAS Analysis Report" (Informe del análisis de KRAS), 4 = "Show" (Mostrar).

Protocolo: detección de las mutaciones de KRAS

Este protocolo se ha diseñado para detectar las mutaciones de KRAS.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Las muestras se pueden analizar con los ensayos de mutación de KRAS siempre y cuando hayan superado el proceso de valoración de muestras.
- Para utilizar el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit de forma eficaz, es preciso agrupar las muestras en lotes de 7 (para rellenar el 72-Well Rotor). Un tamaño de lote inferior implica una capacidad de análisis de muestras inferior con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Compruebe que se haya instalado el software *therascreen* KRAS Assay Package correcto correspondiente a la versión del software Rotor-Gene Q antes de utilizar el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM por primera vez (consulte el apartado Apéndice 2: instalación del software *therascreen* KRAS Assay Package).

Procedimiento

1. Etiquete 8 tubos para microcentrífuga (no suministrados) de acuerdo con las mezclas de reacción correspondientes indicadas en la tabla a continuación. Prepare suficientes mezclas maestras (mezcla de reacción para control o mutación [tubo para CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL o 13ASP] más *Taq* ADN polimerasa [*Taq*]) para las muestras de ADN, una reacción para control positivo (tubo para PC) de KRAS y agua exenta de nucleasas como reacción para control sin molde (tubo para NTC) según los volúmenes indicados en la tabla. Incluya reactivos para 1 muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR. Las mezclas maestras contienen todos los componentes necesarios para la PCR excepto la muestra.

Ensayo y tubo para la mezcla de reacción	Volumen de mezcla de reacción	Volumen de Taq ADN polimerasa
Control (tubo para CTRL)	19,76 μl x (n + 1)	0,24 μl x (n + 1)
12ALA (tubo para 12ALA)	19,76 μl x (n + 1)	0,24 μl x (n + 1)
12ASP (tubo para 12ASP)	19,76 μl x (n + 1)	0,24 μl x (n + 1)
12ARG (tubo para 12ARG)	19,76 μl x (n + 1)	0,24 μl x (n + 1)
12CYS (tubo para 12CYS)	19,76 μl x (n + 1)	0,24 μl x (n + 1)
12SER (tubo para 12SER)	19,76 μl x (n + 1)	0,24 μl x (n + 1)
12VAL (tubo para 12VAL)	19,76 μl x (n + 1)	0,24 μl x (n + 1)
13ASP (tubo para 13ASP)	19,76 μl x (n + 1)	0,24 μl x (n + 1)

* n = número de reacciones (muestras y controles).

Prepare volumen suficiente de mezcla maestra para 1 muestra adicional (n + 1) a fin de asegurar suficiente excedente para la configuración de la PCR. El valor n no debería ser superior a 7 (más los controles), puesto que 7 es el número máximo de muestras por serie analítica.

- Mezcle los reactivos descongelados invirtiendo cada tubo 10 veces para evitar concentraciones localizadas de sales. Centrifugue brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo.
- Utilice una pipeta con un volumen inferior al de la mezcla de reacción total y mezcle bien las mezclas maestras aspirando y eyectando 10 veces con la pipeta.
- Añada inmediatamente 20 μl de la mezcla maestra en cada uno de los tubos en tiras para PCR correspondiente.

Nota: Consulte la tabla 5 para conocer la disposición de los tubos durante la configuración de las mezclas de reacción. Para llevar a cabo la detección de las mutaciones de KRAS, deben añadirse las mezclas maestras a 8 tubos de PC, a 8 tubos de NTC y a 8 tubos para cada muestra de ADN.

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

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

* Los números indican la posición en el bloque de carga y la posición final del rotor.

5. Añada inmediatamente 5 µl de agua exenta de nucleasas como control sin molde (No Template Control, NTC) a los tubos de NTC (posiciones de tubos 9-16) y tápelos.
6. Añada 5 µl de cada muestra de ADN a los tubos de muestra (posiciones de tubos 17 a 72) y tápelos.
7. Añada 5 µl de control positivo (Positive Control, PC) para KRAS a los tubos de PC (posiciones de tubos 1 a 8) y tápelos.
8. Con un rotulador permanente, marque las tapas de los primeros tubos en la posición numérica más baja 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.
9. Invierta 4 veces los tubos tapados para mezclar la muestra y la mezcla de reacción.
10. Con ayuda de las marcas de orientación, 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 analítica (tabla 5).

Nota: Cada serie de PCR admite un máximo de 7 muestras. Si el rotor no está totalmente lleno, deben ocuparse todas las posiciones no utilizadas con tubos vacíos tapados. De este modo, se garantiza la eficiencia térmica del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

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.
12. Inicie el software Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Para ello, haga doble clic en el icono theascreen KRAS Locked Template (Molde bloqueado para KRAS de theascreen) situado en el escritorio del ordenador portátil conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (figura 11).

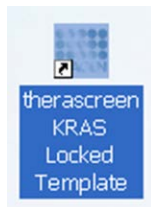


Figura 11. Icono “theascreen KRAS Locked Template” (Molde bloqueado para KRAS de theascreen).

La pestaña “Setup” (Configuración) se abre de manera predeterminada (figura 12).

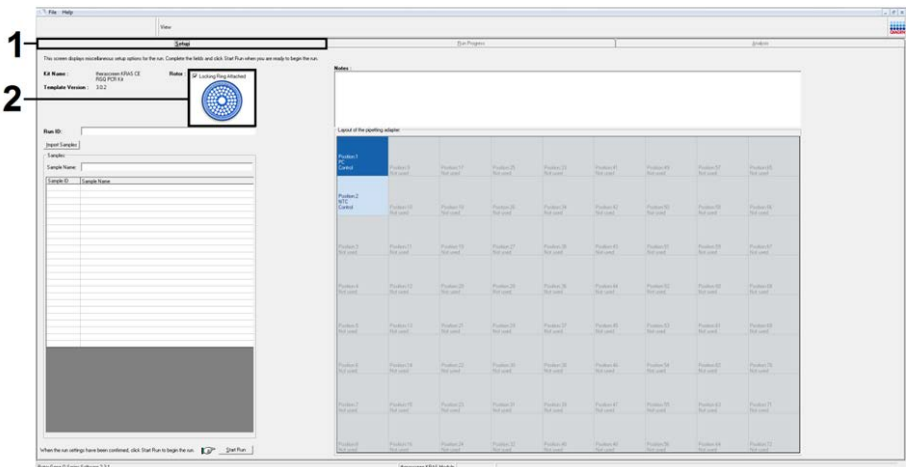


Figura 12. 1 = pestaña “Setup” (Configuración), 2 = casilla “Locking Ring Attached” (Anillo de fijación sujeto).

13. Asegúrese de que el anillo de fijación esté sujeto correctamente y marque la casilla **Locking Ring Attached** (Anillo de fijación sujeto). Cierre la tapa del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
14. Introduzca el identificador de la serie en el cuadro de diálogo Run ID (Identificador de la serie) de acuerdo con la convención de nomenclatura local.
15. Escriba el nombre de la muestra en el cuadro de diálogo Sample Name (Nombre de la muestra) según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Intro.

Al hacerlo, se añade el nombre de la muestra a la lista de muestras que aparece más abajo y se le asigna un "Sample ID" (Identificador de la muestra) (1, 2, 3, etc.). Además, se actualiza el panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo) situado a la derecha con el nombre de la muestra (figura 13).

Nota: En el panel Layout of the pipetting adapter (Esquema del adaptador de pipeteo), compruebe que el nombre de la nueva muestra aparezca resaltado con un color distinto y que los 8 ensayos de la columna del círculo de muestras estén resaltados (figura 13).

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

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

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

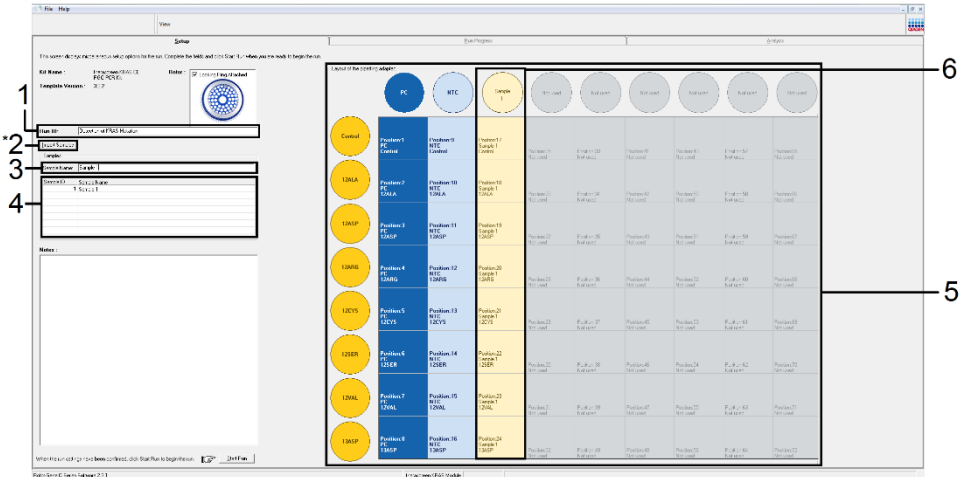


Figura 13. Introducción del “Run ID” (Identificador de la serie) y del “Sample Name” (Nombre de la muestra). 1 = cuadro de diálogo “Run ID” (Identificador de la serie), 2 = botón “Import Samples” (Importar muestras) (no disponible con la versión del software 2.1), 3 = campo de diálogo “Sample Name” (Nombre de la muestra), 4 = Lista de muestras, 5 = panel “Layout of the pipetting adapter” (Esquema del adaptador de pipeteo), 6 = Círculo de la muestra resaltado y columna de 8 ensayos debajo.

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

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

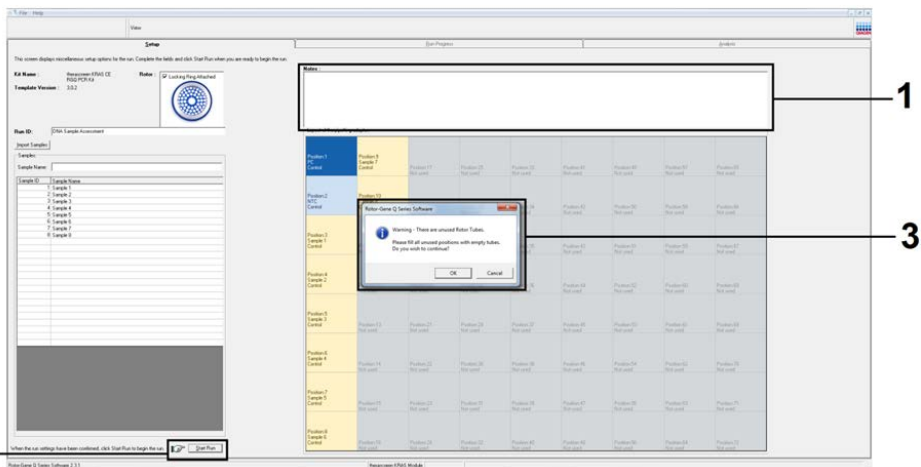


Figura 14. Introducción de nombres de muestra adicionales en el campo de diálogo "Sample Name" (Nombre de la muestra). 1 = cuadro de diálogo "Sample Name" (Nombre de la muestra), 2 = Lista de muestras, 3 = panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo) con nombres de muestra adicionales.

17. Cuando haya terminado de introducir todos los nombres de las muestras, compruebe que sean correctos. Si es necesario, incluya cualquier información adicional en el campo Notes (Notas) y haga clic en el botón Start Run (Iniciar la serie) (figura 15).

Nota: Si queda alguna posición del rotor vacía, aparecerá el mensaje "Warning" (Advertencia) (figura 15 y figura 16) para recordarle que deben ocuparse todas las posiciones sin utilizar del rotor con tubos vacíos tapados. Compruebe que todas las posiciones sin utilizar del rotor contengan un tubo vacío tapado y haga clic en OK (Aceptar) para continuar.

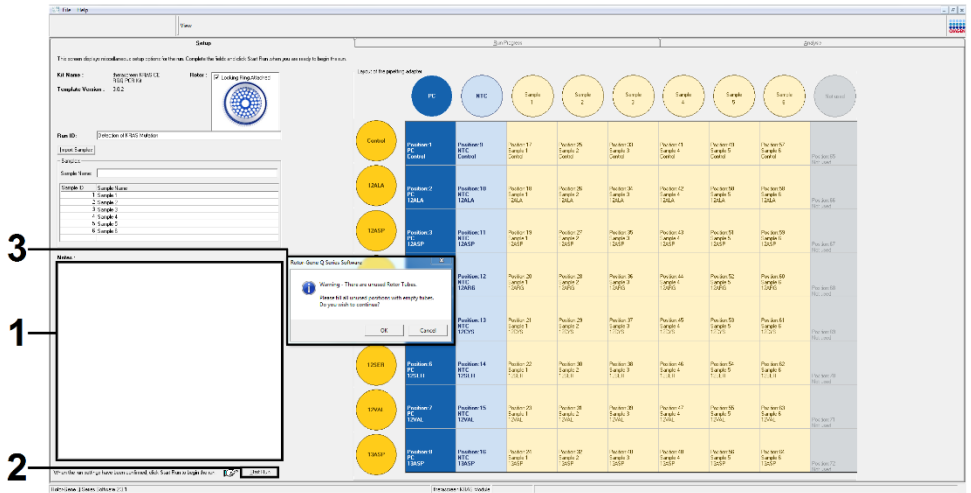


Figura 15. 1 = cuadro de diálogo “Notes” (Notas), 2 = botón “Start Run” (Iniciar la serie), 3 = mensaje “Warning” (Advertencia) sobre las posiciones sin utilizar del rotor.

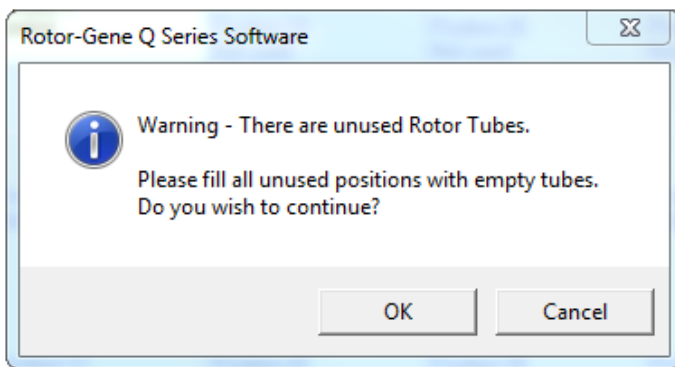


Figura 16. Mensaje “Warning” (Advertencia) sobre las posiciones sin utilizar del rotor.

18. En la ventana Save As (Guardar como), seleccione un nombre de archivo adecuado y guarde la serie de PCR como un archivo de ejecución *.rex en la ubicación seleccionada (figura 17).

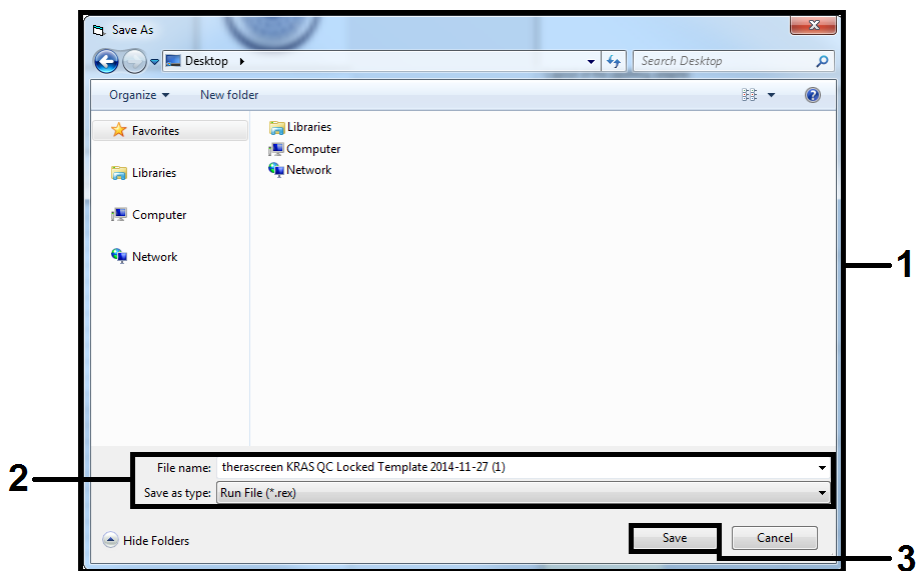


Figura 17. Guardado del archivo de ejecución.

Comienza la serie de PCR.

Nota: Cuando empieza la serie, la pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie) se abre automáticamente para mostrar el registro de la temperatura y el tiempo restante para finalizar la serie (figura 18).

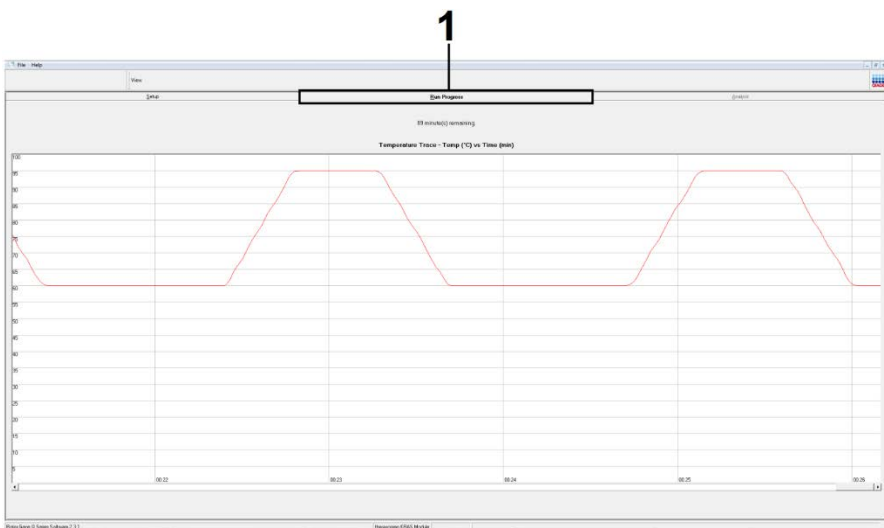


Figura 18. Pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie).

Una vez finalizada la serie, se abre automáticamente la pestaña "Analysis" (Análisis).

Nota: Si la pestaña "Analysis" (Análisis) no se abre, haga clic en la pestaña "Analysis" (Análisis) (figura 19).

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

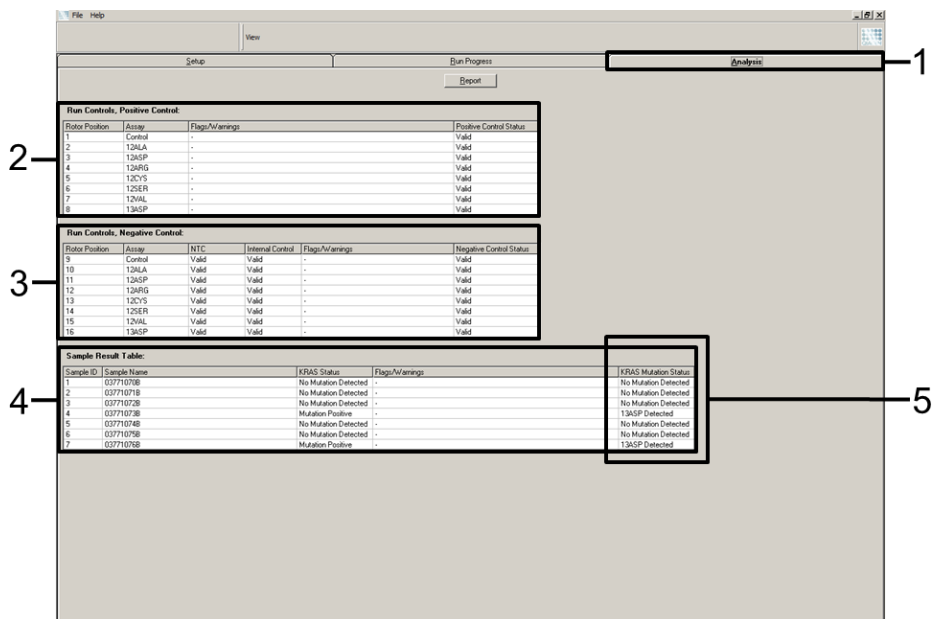


Figura 19. Pestaña “Analysis” (Análisis) e informe de los resultados. 1 = pestaña “Analysis” (Análisis), 2 = panel “Run Controls, Positive Control” (Controles de la serie, control positivo), 3 = panel “Run Controls, Negative Control” (Controles de la serie, control negativo), 4 = “Sample Result Table” (Tabla de resultados de la muestra), 5 = columna “KRAS Mutation Status” (Estado de la mutación de KRAS).

Los resultados del ensayo se presentan de la siguiente manera (figura 19).

- Panel “Run Controls, Positive Control” (Controles de la serie, control positivo): si los resultados se hallan dentro del rango aceptable, en la columna “Positive Control Status” (Estado del control positivo) aparecerá un resultado “Valid” (Válido); de lo contrario, aparecerá un resultado “Invalid” (No válido).
- Panel “Run Controls, Negative Control” (Controles de la serie, control negativo): si tanto el resultado para “NTC” como para “Internal Control” (Control interno) se hallan dentro de los intervalos aceptables, aparecerá un resultado “Valid” (Válido) en la columna “Negative Control Status” (Estado del control negativo); de lo contrario, aparecerá un resultado “Invalid” (No válido).

- Panel “Sample Result Table” (Tabla de resultados de la muestra): en la columna “KRAS Mutation Status” (Estado de la mutación de KRAS) se muestran las mutaciones específicas en las muestras positivas para la mutación.

19. Para generar los archivos de informe, haga clic en Report (Informe). Aparecerá la ventana “Report Browser” (Explorador de informes). En el apartado “Templates” (Moldes), seleccione KRAS Analysis Report (Informe del análisis de KRAS) y, luego, haga clic en Show (Mostrar) (figura 20).

Nota: Existe la posibilidad de guardar los informes en otra ubicación en formato de archivo Web si se hace clic en Save As (Guardar como) situado en la esquina superior izquierda de cada informe.

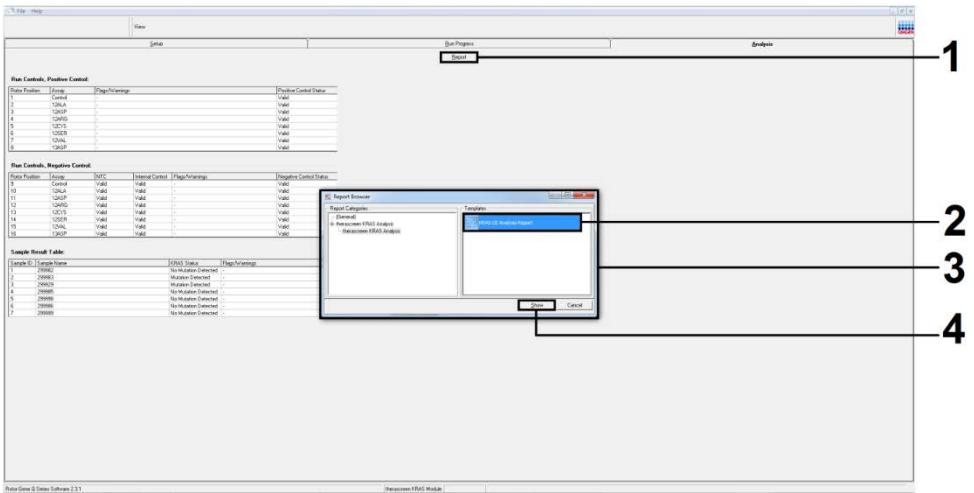


Figura 20. Selección de “KRAS Analysis Report” (Informe del análisis de KRAS). 1 = “Report” (Informe), 2 = ventana “Report Browser” (Explorador de informes), 3 = selección de “KRAS Analysis Report” (Informe del análisis de KRAS), 4 = “Show” (Mostrar).

Interpretación de los resultados

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

Nota: Para obtener información sobre el análisis manual, consulte el apartado Apéndice 1: protocolo manual del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

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

El software Rotor-Gene Q interpola las señales de fluorescencia entre 2 valores registrados cualesquiera. Por lo tanto, los valores de C_T pueden ser cualquier número real (no solamente enteros) comprendido entre 0 y 40.

Para el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, el valor umbral se ha definido en 0,05 unidades relativas de fluorescencia. Este valor se configura en el software *therascreen* KRAS Assay Package para los dos canales de fluorescencia: Green y Yellow. El valor umbral se ha definido durante el desarrollo del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Para determinar el valor de ΔC_T se realiza un cálculo con la siguiente ecuación:

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

Se revisan los controles de la serie (control positivo, NTC y controles internos) para asegurar la obtención de valores de C_T aceptables y que las reacciones se realicen correctamente.

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

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

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

En el apartado "Protocolo: valoración de las muestras de ADN" de este manual encontrará la explicación de otros posibles resultados que también pueden aparecer.

En casos poco frecuentes, un tumor puede contener más de una mutación. En estos casos, se identificará la mutación con un valor de ΔC_T más bajo.

Guía para la resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions, FAQ) de nuestro Centro de servicio técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y/o 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 www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Resultados no válidos

- | | |
|---|---|
| a) Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes no cumplían las instrucciones indicadas en la sección Almacenamiento y manipulación de reactivos. | Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta del kit) y, si es necesario, utilice un kit nuevo. |
| b) El <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit está caducado. | Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta del kit) y, si es necesario, utilice un kit nuevo. |

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

- | | |
|---|--|
| Se ha producido contaminación durante la preparación de la PCR. | Repita la PCR con reactivos nuevos en réplicas.
Si fuera posible, cierre los tubos de PCR justo después de añadir la muestra que va a analizarse.
Compruebe periódicamente que el espacio y los instrumentos de trabajo no estén contaminados. |
|---|--|

Indicadores generados por el software *therascreen* KRAS Assay Package

La tabla 6 recopila los posibles indicadores que puede generar el software *therascreen* KRAS Assay Package, su significado y las acciones que deben llevarse a cabo.

Tabla 6. Indicadores del software *therascreen* KRAS Assay Package

Indicador	Significado	Acción
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Serie de PCR no válida: el valor de CT de FAM está fuera del intervalo para el control positivo de la reacción para control.	Repita toda la serie de PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Serie de PCR no válida: el valor de CT de FAM está fuera del intervalo para una o más reacciones para control de mutación.	Repita toda la serie de PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia del control positivo (mezcla de reacción para control o CTRL).	Repita toda la serie de PCR.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia del control positivo (mezcla de reacción para la mutación).	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Serie de PCR no válida: control interno por encima del intervalo para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Serie de PCR no válida: control interno por debajo del intervalo para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INVALID_CT	Serie de PCR no válida: valor de FAM no válido (inferior al límite) para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INVALID_DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Muestra no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control de la muestra.	Configure una PCR nueva para repetir las muestras relevantes.

SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Muestra no válida: valor de C_T de FAM demasiado bajo para el control de la muestra.	Diluya la muestra para aumentar el valor de C_T del control. Calcule la dilución teniendo en cuenta que una dilución 1:1 con el agua suministrada con el kit permite aumentar el valor de C_T en 1,0; cuando haya diluido la muestra, configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Muestra no válida: valor de C_T de FAM demasiado alto para la reacción para control de la muestra.	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado sigue siendo no válido al repetir la serie de PCR, extraiga la muestra de una sección o secciones FFPE nueva(s). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado sigue siendo no válido, repita la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Valor de C_T demasiado alto (o ausencia de C_T) para el control interno (HEX), canal FAM negativo para la mutación.	<p>Si el estado de la muestra es válido, no es preciso realizar ninguna acción.</p> <p>Muestras de CRC: si el estado de la muestra no es válido, configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado sigue siendo no válido al repetir la serie de PCR, extraiga la muestra de una sección o secciones FFPE nueva(s). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado sigue siendo no válido, repita la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.</p> <p>Muestras de NSCLC: si el estado de la muestra no es válido, diluya la muestra restante en una proporción 1:8 con agua del tubo marcado como DIL, asegurándose de que el volumen final es superior a 40 μl (p. ej., 10 μl de ADN y 70 μl de agua del tubo marcado como DIL) y configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado sigue siendo no válido al repetir la serie de PCR, extraiga la muestra de una sección o secciones FFPE nueva(s). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si resulta no válida, diluya la muestra restante en una proporción 1:8 con agua del tubo marcado</p>

		<p>como DIL asegurándose de que el volumen final es superior a 40 µl y analice esta dilución. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.</p>
SAMPLE_INT_CTRL _EARLY_CT	<p>Tubo para mutación no válido: el valor de C_T de HEX es demasiado bajo para la muestra (control interno).</p>	<p>Si el estado de la muestra es válido, no es preciso realizar ninguna acción.</p> <p>si el estado de la muestra no es válido, configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra.</p> <p>Si el resultado sigue siendo no válido al repetir la serie de PCR, extraiga la muestra de una sección o secciones FFPE nueva(s). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado sigue siendo no válido, repita la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.</p>
SAMPLE_INVALID _DATA	<p>Tubo para mutación no válido: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control interno.</p>	<p>Si el estado de la muestra es válido, no es preciso realizar ninguna acción.</p> <p>Si el estado de la muestra no es válido, configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado sigue siendo no válido al repetir la serie de PCR, extraiga la muestra de una sección o secciones FFPE nueva(s). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado sigue siendo no válido, repita la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.</p>

MUTATION_EARLY_ CT	Tubo para mutación no válido: el valor de C _T de FAM es demasiado bajo para la muestra.	Si el estado de la muestra es válido, no es preciso realizar ninguna acción. Si el estado de la muestra no es válido, configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado sigue siendo no válido al repetir la serie de PCR, extraiga la muestra de una sección o secciones FFPE nueva(s). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado sigue siendo no válido, repita la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.
SAMPLE_POSITIVE _AND_INVALID	Una o más mutaciones de la muestra son válidas y positivas, a la vez que una o más mutaciones de la misma muestra no son válidas (se genera una advertencia, no un error).	Ninguna.

Control de calidad

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

Limitaciones

La prueba se ha diseñado para detectar 7 mutaciones en los codones 12 y 13 del gen KRAS. Es posible que las muestras con un resultado “No Mutation Detected” (Mutación no detectada) incluyan mutaciones de KRAS que no se pueden detectar con este ensayo (p. ej., 13CYS).

La detección de las mutaciones depende de la integridad de la muestra y del volumen de ADN amplificable que contiene el material de muestra. Debe repetirse el procedimiento cuando la valoración inicial del ADN de la muestra indique que la cantidad no es suficiente o es demasiado elevada para el análisis de mutación.

El *therascreen* KRAS 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 de la mezcla de reacción.

La finalidad exclusiva del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit es la discriminación entre ADN nativo y mutado. La prueba se ha diseñado de forma que cada reacción para mutación presente la máxima sensibilidad para la mutación específica que esté determinando. Sin embargo, puede observarse una reactividad cruzada con otras reacciones de mutación en las muestras positivas para alguna mutación. Cuando más de una reacción para mutación resulta positiva, el resultado generado corresponde al valor de ΔC_T más bajo.

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit solamente se ha validado para tejido FFPE de CRC y NSCLC.

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se ha validado solamente para su uso con el QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Únicamente se ha validado el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM para su uso con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Características de rendimiento

Rendimiento analítico

Las características específicas de rendimiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se han determinado mediante estudios de análisis de muestras de tejido FFPE obtenidas de pacientes con CRC y NSCLC. Entre los métodos de obtención de muestras de NSCLC se incluyen la punción biopsica con aguja gruesa (Core Needle Biopsy, CNB), la aspiración con aguja fina (Fine Needle Aspirate, FNA) y la resección. Para cada tipo de muestra, se utilizaron 8 líneas celulares humanas FFPE, 7 de las cuales contenían mutaciones de KRAS conocidas detectables por el ensayo y, la octava, secuencias de KRAS nativo (es decir, sin mutaciones en los codones 12 y 13). El estado de mutación de las muestras se ha confirmado mediante la secuenciación bidireccional de Sanger.

Punto de corte

Para establecer los valores de corte del ensayo, se analizaron 225 muestras FFPE con un método conforme a los requerimientos de CLSI EP17-A (2004) (8). El intervalo de C_T para la reacción de control se estableció entre 21,92 y 32,00. En la tabla 7 se presentan los valores de corte, calculados a partir del valor de C_T de las reacciones para mutación (ΔC_T) menos el valor de C_T de la reacción para control.

Tabla 7 Valores de corte establecidos para cada ensayo de mutación.

	Ensayo de mutación						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Valor de corte ($\leq \Delta C_T$)	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

Límite de blanco

Para valorar el rendimiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit en ausencia de molde positivo para la mutación y para garantizar que una muestra de blanco no genere una señal analítica que pueda indicar una concentración baja de la mutación, se evaluaron las muestras sin molde. Los resultados no mostraron ningún valor de C_T para el ensayo de mutación o de control en ninguno de los tubos de reacción para mutación o control (todos los valores de C_T del control interno fueron válidos).

Comparación con el método de referencia analítico: CRC

Se realizaron dos estudios para demostrar la concordancia del estado de mutación de las muestras de CRC analizadas con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y con el método de secuenciación bidireccional. Un total de 137 de las muestras FFPE generaron resultados válidos tanto con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit como con la secuenciación bidireccional.

Los resultados globales, a excepción de las 6 muestras que resultaron erróneas con el método de secuenciación bidireccional de Sanger, se muestran en la tabla 8. La tabla 9 muestra el análisis de concordancia entre el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y la secuenciación bidireccional.

Tabla 8. theascreen KRAS RGQ PCR Kit frente al método de secuenciación bidireccional de Sanger

		Identificación de mutaciones con el método de secuenciación bidireccional							Total	
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL		13ASP
Identificación con el <i>theascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativa	80	-	-	1	-	-	-	1	82
	Positiva 12ALA	-	3	-	-	-	-	-	-	3
	Positiva 12ARG	-	-	-	1	-	-	-	-	1
	Positiva 12ASP	-	-	-	20	-	-	-	-	20
	Positiva 12CYS	-	-	-	-	3	-	-	-	3
	Positiva 12SER	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	Positiva 12VAL	2	-	-	-	-	-	14	-	16
	Positiva 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	11	12
	Total	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Tabla 9. Análisis del grado de concordancia

Medida de concordancia	Frecuencia (%)	Intervalo de confianza (IC) del 95 %
Porcentaje de concordancia global	152/157 (96,82)	93,69-98,44
Porcentaje de concordancia positiva	72/74 (96,30)	92,63-98,63
Porcentaje de concordancia negativa	80/83 (96,39)	91,65-98,19

Se evaluó un segundo conjunto de muestras exclusivo para complementar los datos del primer estudio. Se recopilieron 271 muestras FFPE de CRC; se compararon los resultados de 250 muestras con un estado mutacional desconocido y 21 muestras con un estado mutacional conocido (para multiplicar las mutaciones poco frecuentes) con el método de secuenciación bidireccional de Sanger según los criterios explicados anteriormente.

Se realizó un análisis de concordancia con 247 muestras y los resultados obtenidos fueron válidos tanto con el método de secuenciación bidireccional como con el *theascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Se identificaron 9 muestras discordantes. En total, la concordancia obtenida

fue del 96,82 %. Estos datos demuestran la eficacia y precisión de rendimiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (tabla 10 y tabla 11).

Tabla 10. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit frente a secuenciación bidireccional de Sanger (segundo estudio)

		Identificación de mutaciones con el método de secuenciación bidireccional							Total	
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL		13ASP
Identificación con el <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativa	132	–	–	–	–	1	–	–	133
	Positiva 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	–	10
	Positiva 12ARG	5	–	5	–	–	–	–	–	10
	Positiva 12ASP	–	–	–	31	–	–	–	–	31
	Positiva 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	–	12
	Positiva 12SER	–	–	–	–	–	13	–	–	13
	Positiva 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	–	27
	Positiva 13ASP	–	–	–	–	–	–	–	11	11
	Total	140	10	5	31	11	14	25	11	247

Tabla 11. Análisis de concordancia (segundo estudio)

Medida de concordancia	Frecuencia (%)	Intervalo de confianza (IC) del 95 %
Porcentaje de concordancia global	238/247 (96,36)	93,73-98,09
Porcentaje de concordancia positiva	106/107 (99,07)	95,64-99,95
Porcentaje de concordancia negativa	132/140 (94,29)	89,93-97,13

Comparación con el método de referencia analítico: NSCLC

Para demostrar la concordancia del estado mutacional de las muestras de NSCLC analizadas con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit en comparación con la secuenciación bidireccional de Sanger, se obtuvieron muestras clínicas FFPE de NSCLC mediante resección, CNB o FNA. Se extrajo ADN de cada muestra antes de realizar el análisis con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Los resultados de esta prueba se compararon con los obtenidos mediante secuenciación bidireccional de Sanger.

Un total de 360 muestras arrojaron un resultado válido tanto para el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit como para la secuenciación bidireccional de Sanger, de las cuales 340 muestras presentaron resultados concordantes.

En la tabla 12 se muestra la concordancia entre el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y el método de secuenciación bidireccional. Dos muestras obtuvieron identificaciones de mutación doble mediante la secuenciación bidireccional de Sanger. Dado que una mutación coincidía con el resultado del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, estas muestras se clasificaron como concordantes para el análisis de concordancia general, concordancia positiva y concordancia negativa (tabla 13).

Tabla 12. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit frente al método de secuenciación bidireccional de Sanger

		Identificación de mutaciones con el método de secuenciación bidireccional								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Total
Identificación con el <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativa	132	-	-	-	-	1	-	-	133
	Positiva 12ALA	-	10	-	-	-	-	-	-	10
	Positiva 12ALA_12CYS	5	-	5	-	-	-	-	-	10
	Positiva 12ARG	-	-	-	31	-	-	-	-	31
	Positiva 12ASP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positiva 12CYS	1	-	-	-	11	-	-	-	12
	Positiva 12SER	-	-	-	-	-	13	-	-	13
	Positiva 12VAL	2	-	-	-	-	-	25	-	27
	Positiva 13ASP	-	-	-	-	-	-	-	11	11
	Total	140	10	5	31	11	14	25	11	247

Tabla 13. Análisis del grado de concordancia

Medida de concordancia	Frecuencia (%)	Intervalo de confianza (IC) del 95 %
Porcentaje de concordancia global	340/360 (94,44)	92,03-96,29
Porcentaje de concordancia positiva	79/80 (98,75)	94,21-99,94
Porcentaje de concordancia negativa	261/280 (93,21)	90,20-95,51

Límite de detección (Limit of Detection, LoD)

El intervalo de funcionamiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se basa en la cantidad de ADN amplificable del material de muestra determinado por el valor de C_T de la reacción para control. El intervalo de introducción establecido para el ensayo viene definido por el intervalo especificado previamente para el valor de C_T de control comprendido entre 21,92 y 32,00. El valor de LoD es el porcentaje mínimo de ADN mutado que se puede detectar en un fondo del material nativo (no mutado) cuando el ADN amplificable total se halla dentro del intervalo de introducción establecido pero por debajo del valor de ΔC_T de corte del umbral.

CRC

Se realizó un estudio para determinar el LoD de cada una de las 7 reacciones específicas para mutaciones del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. En el caso del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, el límite de detección de ADN mutado en un fondo de ADN nativo se define como el factor de dilución más bajo en el que el 95 % de las réplicas de prueba de cada muestra positiva para mutación genera un resultado positivo.

Se aplicaron modelos de regresión logística individualmente a cada ensayo para los conjuntos de datos con un nivel alto y bajo de ADN introducido. En estos modelos, la variable de respuesta utilizada fue el resultado binario de mutación detectada (detección = 1) y mutación no detectada (detección = 0), mientras que la variable explicativa continua utilizada fue la dilución del porcentaje de mutación en forma de logaritmo binario (\log_2). Los LoD se calcularon como la dilución del porcentaje de mutación con la que se obtiene una probabilidad de detección predicha del 0,95 (tabla 14).

Tabla 14. Valores de LoD de cada ensayo de mutación con líneas celulares FFPE

Ensayo	C₉₅ del valor de LoD (porcentaje de ADN mutado en ADN nativo)
12ALA	0,77
12ARG	2,56
12ASP	6,43
12CYS	1,47
12SER	5,65
12VAL	1,60
13ASP	6,42

NSCLC

El LoD de los ensayos realizados con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se determinó y verificó mediante tejido de CRC. Estos resultados del LoD se han vuelto a verificar para tejido de NSCLC.

El estudio se dividió en 2 partes. En la parte 1, se diluyeron 60 réplicas de 7 líneas celulares mutantes FFPE de NSCLC que representaban cada una de las mutaciones según el LoD del ensayo correspondiente y se procedió a su análisis. Las 60 réplicas de líneas celulares FFPE válidas para cada muestra evaluadas demostraron una detección del 100 % para la reacción de mutación correspondiente según el LoD determinado.

En la parte 2, se analizaron 96 réplicas de muestras clínicas FFPE de NSCLC que representaban cada una de las mutaciones con los 3 métodos de adquisición (resección, CNB y FNA) después de diluirse según el LoD del ensayo correspondiente.

Las 96 réplicas válidas para 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL y 13ASP mostraron una identificación correcta del 100 %. Los ensayos para 12CYS y 12SER obtuvieron una detección del 95,8 % en el LoD.

De este modo, se demuestra que el valor de LoD determinado anteriormente está verificado para todos los ensayos de mutación cuando se valoran muestras de tejidos de NSCLC y muestras clínicas de NSCLC FFPE/líneas celulares FFPE/muestras emparejadas de pacientes.

Introducción de ADN y linealidad

Impacto del nivel de ADN introducido sobre los valores de ΔC_T

Cuando muestras con niveles diferentes de ADN total contienen la misma proporción de ADN mutado, lo más lógico es que los valores de ΔC_T medidos se mantengan estables. Se utilizó ADN extraído de 8 líneas celulares FFPE para preparar grupos de ADN que generaran el valor de C_T más bajo posible de la reacción para control.

En la tabla 15 y la tabla 16 se muestra el intervalo de dilución de cada reacción para mutación y el valor de ΔC_T medio de los resultados. Los valores de ΔC_T globales son consistentes a lo largo del intervalo de funcionamiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit para todos los ensayos, lo que demuestra que el nivel de ADN no repercute en la exactitud de la identificación de mutaciones en las muestras.

Tabla 15. Efecto del ADN introducido sobre los valores de ΔC_T en el intervalo de valores de C_T de la reacción para control de introducción (líneas celulares FFPE de CRC)

Ensayo	ΔC_T				
	Dilución 1 $C_T \sim 20-21$	Dilución 2 $C_T \sim 23-24$	Dilución 3 $C_T \sim 26-27$	Dilución 4 $C_T \sim 29-30$	Dilución 5 $C_T \sim 32-33$
12ALA	1,56	1,25	1,16	1,14	1,27
12ASP*	2,46	2,18	2,11	2,11	1,75
12ARG	1,18	0,63	1,08	0,94	1,06
12VAL	0,29	0,25	0,15	0,26	-0,1
12SER	2,91	2,21	2,15	2,15	2,08
12CYS	0,98	0,71	0,58	0,81	0,67
13ASP	3,57	2,84	2,54	2,46	2,62

* El número total de réplicas para 12ASP fue de 27.

Tabla 16. Efecto del ADN introducido sobre los valores de ΔC_T en el intervalo de valores de C_T de la reacción para control de introducción (con muestras FFPE de NSCLC)

Ensayo	ΔC_T				
	Dilución 1 $C_T \sim 20-21$	Dilución 2 $C_T \sim 23-24$	Dilución 3 $C_T \sim 26-27$	Dilución 4 $C_T \sim 29-30$	Dilución 5 $C_T \sim 32-33$
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
12ASP	3,63	2,92	2,55	2,46	–*
12ARG	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
12VAL	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
12SER	5,34	4,50	4,30	3,92	–*
12CYS	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
13ASP	6,24	5,36	5,14	4,87	–*

* Ningún valor de C_T para la reacción de mutación obtenido debido a una concentración baja de ADN; por lo tanto, no se calculó ningún valor de ΔC_T .

Linealidad/eficiencia de amplificación como función del ADN introducido

Se ha demostrado la linealidad y la eficiencia de amplificación de la PCR para cada reacción de mutación con relación a la reacción para control en todo el intervalo de funcionamiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Se ha calculado la eficiencia de amplificación de cada una de las reacciones para mutación y control como $[2(-1/\text{pendiente})] - 1$.

La eficiencia de amplificación del control comparada con la reacción para mutación indica que el valor de ΔC_T y, por lo tanto, la identificación de mutaciones, se mantiene estable a lo largo de todo el intervalo de funcionamiento del ensayo. En la tabla 17 y la tabla 18 se resumen estos datos.

Linealidad/eficiencia de amplificación como función del porcentaje de mutación

El objetivo de este estudio era valorar el efecto de una muestra positiva para mutación diluida en serie sobre la eficiencia de amplificación a lo largo de todo el intervalo de

funcionamiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, empezando por los niveles de introducción de C_T de aproximadamente C_T 22-23.

Inicialmente, se valoraron los extractos de ADN de las líneas celulares FFPE de CRC y las muestras de NSCLC mediante lecturas de densidad óptica antes de realizar la PCR con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. A continuación, se prepararon stocks de ADN para un C_T de reacción para control de C_T 23 aproximadamente. Se realizó una dilución en serie de los stocks por duplicado, utilizando ambas veces ADN nativo a fin de mantener constante el ADN nativo total a pesar de variar el porcentaje de ADN mutado del molde.

Se prepararon grupos de ADN suficientes para realizar 6 réplicas por mutación. Se calcularon los valores de C_T y ΔC_T de cada mutación en todos los puntos de dilución. Se aplicó un modelo de regresión lineal para comparar el C_T de reacción para mutación con la dilución de ADN introducido en logaritmo base 2 (\log_2). El estudio muestra que la dilución de las mutaciones en un fondo con una concentración estable de ADN nativo se traduce en eficiencias de amplificación que no varían significativamente respecto a los valores determinados en el estudio de linealidad mencionado anteriormente.

Tabla 17. Eficiencia de amplificación en reacciones para control y mutación: Líneas celulares de CRC

Muestra		Intersección	Error estándar de intersección	Pendiente calculada	Error estándar (pendiente)	Límite de confianza del 95 % bilateral inferior (pendiente)	Límite de confianza del 95 % bilateral superior (pendiente)	Eficiencia de amplificación	Diferencia en eficiencias de amplificación
12ALA	C _T de control	21,060	0,060	-1,008	0,007	-1,023	-0,993	0,989	0,03
	C _T de 12ALA	22,476	0,103	-0,987	0,013	-1,013	-0,961	1,019	
12ARG	C _T de control	20,825	0,083	-1,035	0,01	-1,056	-1,014	0,954	0,056
	C _T de 12ARG	23,237	0,083	-0,993	0,011	-1,016	-0,97	1,01	
12ASP	C _T de control	20,385	0,13	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	0,982	-0,003
	C _T de 12ASP	21,347	0,065	-1,015	0,008	-1,032	-0,999	0,979	
12CYS	C _T de control	23,437	0,063	-0,981	0,01	-1,003	-0,96	1,026	0,032
	C _T de 12CYS	24,289	0,039	-0,961	0,006	-0,974	-0,947	1,058	
12SER	C _T de control	22,568	0,050	-1,003	0,008	-1,02	-0,986	0,996	0,105
	C _T de 12SER	25,212	0,087	-0,934	0,014	-0,963	-0,904	1,101	
12VAL	C _T de control	21,208	0,047	-0,995	0,006	-1,007	-0,983	1,007	0,033
	C _T de 12VAL	21,532	0,043	-0,972	0,005	-0,983	-0,961	1,04	
13ASP	C _T de control	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	0,999	0,145
	C _T de 12ASP	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	1,144	

Tabla 18. Eficiencia de amplificación en reacciones para control y mutación: muestras de NSCLC

Muestra		Intersección	Error estándar de intersección	Pendiente calculada	Error estándar (pendiente)	Límite de confianza del 95 % bilateral inferior (pendiente)	Límite de confianza del 95 % bilateral superior (pendiente)	Eficiencia de amplificación	Diferencia en eficiencias de amplificación
12ALA	C _T de control C _T de 12ALA	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11	0,94	0,069
		24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93	1,01	
12ARG	C _T de control C _T de 12ARG	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05	0,94	0,093
		24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	-0,96	1,04	
12ASP	C _T de control C _T de 12ASP	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08	0,96	-0,001
		22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95	0,96	
12CYS	C _T de control C _T de 12CYS	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08	0,98	0,019
		22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99	1,00	
12SER	C _T de control C _T de 12SER	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02	0,97	0,127
		25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94	1,09	
12VAL	C _T de control C _T de 12VAL	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,92	0,011
		23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88	0,91	
13ASP	C _T de control C _T de 12ASP	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	0,94	0,066
		25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	1,01	

Sustancias interferentes

El objetivo del estudio era evaluar el impacto de posibles sustancias interferentes en el rendimiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Para ello, se analizó el impacto de cada sustancia, añadiendo experimentos con varias concentraciones, en los valores de ΔC_T y el estado mutacional de las muestras de la prueba. Las posibles sustancias interferentes del proceso de extracción de ADN analizadas fueron las siguientes: Buffer AL, Buffer ATL, etanol, cera de parafina, proteinasa K, Wash Buffer AW1, Wash Buffer AW2 y xileno. También se analizó el tampón de elución final del kit (Buffer ATE) como control en blanco.

En las concentraciones esperadas en un uso normal, ninguna de las posibles sustancias interferentes evaluadas tienen impacto en la capacidad del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit para distinguir entre muestras positivas y negativas a la mutación.

Además del estudio de las sustancias interferentes, se valoró el posible efecto de la necrosis en muestras clínicas a fin de determinar si los niveles altos de tejido necrótico en las muestras tumorales pueden tener algún impacto en la posibilidad de generar datos válidos. Del total de 421 muestras evaluadas en los estudios de Comparación con el método de referencia analítico, 29 presentaron un nivel de necrosis >50 % según la revisión patológica. De estas 29 muestras, 28 generaron resultados válidos coincidentes con los de la secuenciación bidireccional Sanger. Solamente un resultado no fue válido debido a un volumen de ADN insuficiente.

Contaminación cruzada

El objetivo de este estudio era determinar el alcance de la contaminación cruzada (que puede dar lugar a resultados falsos positivos) entre muestras de ADN cuando se utiliza el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Entre las posibles fuentes de contaminación cruzada figuran:

- Extracción de las muestras (p. ej., al rozar un portaobjetos)
- Pipeteo de las muestras
- Colocación del tapón en los tubos de muestras
- Contaminación de los reactivos del kit durante el uso
- Carga de los tubos de ensayo en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Para este estudio se utilizaron los estándares de FFPE: el estándar nativo y el estándar 12ALA (puesto que la reacción para 12ALA es la que tiene el valor de LoD más bajo del kit).

El estudio constó de 10 series de PCR diseñadas para estudiar la posible contaminación tanto entre las diferentes series analizadas en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM como dentro de cada una de las series. En estas series de prueba se utilizaron tubos con ADN nativo para determinar la existencia de contaminación provocada por ADN mutado.

Los resultados de este estudio indicaron que no existía contaminación detectable en ninguna de las extracciones de ADN nativo diseñadas para detectar la contaminación cruzada.

Exclusividad/reactividad cruzada

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se compone de 8 reacciones diferentes, que incluye una única reacción para control que detecta una región no polimórfica del gen KRAS y 7 reacciones para mutaciones específicas. No existe ninguna reacción para medir específicamente la secuencia KRAS nativa en el codón 12 o 13. Así, el resultado “No Mutation Detected” (Mutación no detectada) para KRAS (es decir, la secuencia nativa) se genera cuando no se detecta ninguna de las 7 mutaciones que dan lugar a un resultado positivo para mutación.

Por lo tanto, es necesario determinar la cantidad de amplificación no específica, o reactividad cruzada, existente en cada reacción con cantidades excesivas de ADN nativo de KRAS a fin de evitar la generación de resultados falsos positivos. Asimismo, también es preciso evaluar la amplificación no específica de las mutaciones de KRAS no incluidas como detectables en el ensayo. De este modo, se puede mostrar que la cantidad de reactividad cruzada entre reacciones para mutación no genera identificaciones de mutación erróneas cuando la cantidad de ADN mutado es excesiva. Dado que el ADN introducido para este ensayo se basa en el intervalo de C_T del control (21,92-32,00), la concentración más alta de ADN introducido se basa en un valor de C_T del control de aproximadamente 22.

Amplificación no específica/reactividad cruzada: ADN nativo de KRAS

Se determinó la cantidad de amplificación no específica del ADN nativo generada por mezclas de reacción diseñadas para amplificar mutaciones específicas. Se evaluó un total de 60 réplicas de ADN nativo de líneas celulares FFPE y 60 muestras de NSCLC con la concentración más alta de ADN introducido amplificable con ayuda del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Los valores de C_T obtenidos del control fueron de aproximadamente 22-23. Los resultados mostraron que los valores de ΔC_T superaban los valores de corte establecidos y que al menos el 95 % de las réplicas nativas fueron correctamente identificadas.

Amplificación no específica/reactividad cruzada/exclusividad: ADN de KRAS positivo para la mutación

Se analizaron las muestras mutadas con una concentración alta de ADN introducido frente a todas las mezclas de reacción. Se prepararon muestras de ADN a partir de cada línea celular FFPE de CRC y NSCLC con un valor de C_T de la reacción para control de aproximadamente 23. A partir de estas diluciones, se evaluaron 6 réplicas de cada muestra de mutación. El porcentaje de mutación de la muestra responde al porcentaje de mutación del ADN de la línea celular.

Los valores de ΔC_T medios presentados en la tabla 19 y la tabla 20 muestran la existencia de reactividad cruzada entre las reacciones para mutación. En todos los casos, los resultados muestran que se identificó la mutación correcta con la reacción para mutación emparejada (es decir, el valor de ΔC_T más bajo identifica la mutación correcta). En el resto de las pruebas no fue posible realizar ninguna detección o bien los valores registrados estaban fuera del umbral de ΔC_T .

Tabla 19. Reactividad cruzada (ΔC_T) entre reacciones para mutación con ADN de líneas celulares FFPE de CRC en el intervalo de introducción alto

ADN mutado	Punto de corte	ΔC_T del ensayo						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,42*	12,66	NA	5,81†	2,78†	6,31†	13,21
12ASP	6,6	12,56	2,42*	NA	NA	13,44	11,21	13,55
12ARG	8	13,12	11,56	1,12*	11,42	NA	13,43	12,66
12CYS	8	14,2	12,48	9,23	0,98*	NA	7,96†	12,88
12SER	8	NA	13,39	13,31	NA	3,02*	12,99	13,97
12VAL	7,5	6,83†	NA	NA	NA	13,38	0,28*	13,74
13ASP	7,5	NA	13,29	13,89	NA	NA	14,36	4,5*

NA: sin reacción cruzada.

* Valores de ΔC_T de reacciones emparejadas.

† Valores de ΔC_T de las reacciones que presentan reactividad cruzada por debajo del valor de corte.

Tabla 20. Reactividad cruzada (ΔC_T) entre reacciones para mutación con ADN de líneas celulares FFPE de NSCLC en el intervalo de introducción alto

ADN mutado	Punto de corte	ΔC_T del ensayo						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,31*	12,8	NA	5,01†	2,26†	5,57†	12,65
12ASP	6,6	12,61	1,66*	NA	NA	NA	10,3	12,60
12ARG	8	12,98	11,08	0,81*	11,24	NA	12,66	12,62
12CYS	8	NA	12,22	7,84†	0,56*	NA	13,06	11,84
12SER	8	NA	12,87	13,21	NA	1,93*	13,25	12,93
12VAL	7,5	5,93†	14,29	NA	NA	13,14	0,45*	12,39
13ASP	7,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,02*

NA: sin reacción cruzada.

* Valores de ΔC_T de reacciones emparejadas.

† Valores de ΔC_T de las reacciones que presentan reactividad cruzada por debajo del valor de corte.

Repetibilidad y reproducibilidad

Los objetivos de este estudio eran demostrar la precisión del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit en el mismo laboratorio (repetibilidad) y entre distintos laboratorios (reproducibilidad). Se registraron tanto la corrección de los resultados de identificación de mutación como la precisión de los valores de ΔC_T (la diferencia en los valores de C_T entre la reacción para mutación y la reacción para control).

CRC

Para esta evaluación se utilizaron muestras de CRC clínicas. Se analizaron una muestra nativa y una muestra de cada mutación con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y, para ello, se pidió a 2 usuarios de cada uno de los 3 centros que analizaran todas las muestras y los controles con 3 lotes del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, cada día durante 5 días, realizando 2 series al día y con 2 réplicas de cada muestra en cada serie. También se utilizó el análisis de los componentes de varianza para analizar los valores de C_T y ΔC_T obtenidos para cada reacción de cada muestra.

La reproducibilidad del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit quedó demostrada para muestras con un nivel de mutación bajo (3 x LoD) y muestras nativas al obtenerse un mínimo de 39/40 identificaciones de mutación correctas para todos los ensayos realizados con varios lotes, plataformas y usuarios, tanto dentro de un mismo laboratorio como entre laboratorios. La proporción estimada de muestras 3 x LoD para el análisis de muestras mutadas y nativas se indica tanto de forma global como para cada uno de los centros. De todos los ensayos y combinaciones de muestras, al menos 79 de las 80 réplicas generaron identificaciones correctas de mutación (tabla 21).

Tabla 21. Total de identificaciones correctas

Muestra	Identificaciones correctas del ensayo de mutación						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Con mutación 3 x LoD	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
Nativa (baja)	80/80	79/80	80/80	80/80	79/80	79/80	80/80

NSCLC

Para cada una de las 7 mutaciones de NSCLC de KRAS, se utilizaron 3 muestras correspondientes a cada uno de los 3 tipos de métodos de adquisición de muestras (resección, CNB y FNA). Se utilizaron 6 muestras clínicas nativas adicionales (2 muestras por cada uno de los 3 tipos de métodos de adquisición) para crear grupos de ADN nativo diluido.

Se agruparon varios extractos para cada una de las muestras con mutación para generar un grupo de muestras individual por mutación. Cada grupo de muestras con mutación se diluyó para crear muestras de prueba con niveles de mutación de 1 x LoD y 3 x LoD.

Los laboratorios utilizados en este estudio se encontraban en 3 ubicaciones distintas. Las condiciones de cada laboratorio variaban en cada ubicación por el uso de 2 equipos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, 2 usuarios, 2 lotes del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y 2 series analíticas por día (por usuario) a lo largo de 16 días no consecutivos.

De todos los ensayos y combinaciones de muestras, al menos 284 de las 288 réplicas generaron identificaciones correctas de mutación. La proporción global de identificaciones correctas, combinados todos los ensayos, para el grupo de 1 x LoD fue del 100 %. La proporción global de identificaciones correctas, combinados todos los ensayos, para el grupo de 3 x LoD fue del 99,6 %. La proporción global de identificaciones correctas para las muestras sin mutaciones detectadas (nativas) fue del 100 % (tabla 22).

Tabla 22. Identificaciones correctas para 1 x LoD, 3 x LoD y ADN nativo

Nivel de mutación	Ensayo	Identificaciones correctas	Identificaciones correctas, %	IC del 90 % bilateral inferior
1 x LoD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/284	100	96,85
	12SER	284/284	100	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	288/288	100	98,97
3 x LoD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/288	98,61	96,85
	12SER	284/288	98,61	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	287/287	100	98,96
Nativa		285/285	100	98,95

Variabilidad en la manipulación de muestras

El objetivo de este estudio era evaluar el impacto de la variabilidad en la manipulación de muestras, específicamente en la extracción del ADN, en el rendimiento del kit *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Este estudio complementa el estudio de repetibilidad y reproducibilidad mediante el análisis de la variabilidad en la manipulación de muestras al procesar las mismas secciones FFPE clínicas y de líneas celulares FFPE en 3 centros, seguido de un análisis con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

CRC

Se cortaron 30 secciones secuenciales de 5 μm de cada una de las 10 muestras FFPE de CRC (3 nativas y 1 mutada). Las secciones se enviaron aleatoriamente a 1 de los 3 centros de análisis de forma que cada centro recibiera 10 secciones por muestra FFPE (100 secciones en total). De las 300 extracciones de ADN analizadas, 298 muestras fueron válidas. Se obtuvo una concordancia del 99,33 % entre los 3 centros para la identificación de mutaciones de KRAS.

La comparación por centros entre los valores de ΔC_T medios de las muestras mutadas y nativas presentó una concordancia de resultados bastante elevada. Los resultados muestran la concordancia entre el procedimiento de extracción de ADN y el procesamiento de muestras con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

NSCLC

En este estudio, se utilizaron 13 muestras clínicas de NSCLC (3 x 12ASP, 3 x 12CYS, 4 x 12VAL y 3 nativas), así como 4 muestras de líneas celulares FFPE (12ALA, 12ARG, 12SER y 13ASP). Las muestras representaban los diferentes métodos de adquisición: resección quirúrgica, FNA y CNB. Se utilizaron líneas celulares para representar mutaciones poco frecuentes para las que no se disponía de tejido clínico de NSCLC.

A continuación, los 3 lotes de 20 secciones FFPE se distribuyeron de forma aleatoria en los 3 centros. En cada uno de los 3 centros se realizó una extracción de ADN en un lote de 20 secciones FFPE (10 pares) por cada muestra con mutación y nativa.

Cuando se analizaron todas las preparaciones de muestras en los 3 centros de prueba con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, se identificaron las 7 muestras con mutación y nativas con la identificación de mutación correcta. La identificación global de cada una de las 7 muestras con mutación y nativas fue del 100 %, lo que muestra una consistencia entre distintos centros para la extracción de ADN y la detección de las mutaciones mediante el uso del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Equivalencia de los métodos de adquisición de muestras (solamente NSCLC)

El propósito de este estudio era valorar si el método de adquisición de muestras influía en la identificación de mutación de las muestras de NSCLC determinada por el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Los 3 métodos de adquisición de muestras examinados en este estudio fueron resección, FNA y CNB.

Las muestras obtenidas por CNB y FNA de “pacientes emparejados” para este estudio se obtuvieron a partir de muestras tumorales reseccionadas quirúrgicamente para conseguir que el mismo tumor se pudiera obtener con los 3 métodos de adquisición. Se consiguió un total de 169 muestras obtenidas por resección, 169 por CNB y 169 por FNA para el estudio.

Cada una de las muestras se extrajo y analizó con el ensayo de control de KRAS. Todas las muestras que arrojaron un resultado válido (169 resecciones, 169 CNB y 164 FNA) se analizaron con los 8 ensayos de KRAS.

Asimismo, para cada una de las muestras clínicas FFPE de NSCLC, el ADN extraído utilizado para el análisis con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit también se valoró con la secuenciación bidireccional de Sanger para determinar el nivel de concordancia entre el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y la secuenciación bidireccional de Sanger. En todos los tipos de muestras, el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit determinó de forma precisa el estado mutacional frente a la secuenciación bidireccional de Sanger con una tasa de porcentaje de concordancia global del 96,96 %.

Los resultados de este estudio muestran que el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit proporciona resultados equivalentes con los 3 métodos de obtención estudiados, tal como indican las tasas de porcentaje de concordancia global por pares:

- CNB frente a FNA, un 97,52 (límites de confianza de 94,41-99,15)
- CNB frente a resección, un 96,39 (límites de confianza de 92,99-98,41)
- FNA frente a resección, un 98,76 (límites de confianza de 96,14-99,78)

Referencias

Referencias bibliográficas

1. Hilger, R.A., et al. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25, 511.
2. Bachireddy, P., et al. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* 11, 4278.
3. Han, S.-W. et al. (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and AKT phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* 12, 2538.
4. Pao, W. et al. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Medicine* 2, 57.
5. Newton, C.R. et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503.
6. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
7. Catalog of Somatic Mutations in Cancer: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline. CLSI Document EP17-A*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Referencias de utilidad

Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.

Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.

Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).

Chaft, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.

De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.

Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.

Dingemans, A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.* **3**, 743.

Finocchiaro, G. et al. (2007) EGFR, HER2, and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4021.

Jänne, P.A. et al. (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **1**, 38.

Karapetis C. et al. (2008) KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008.

Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.

Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.

Lievre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992.

Reckamp, K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* **120**, 1145.

Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).

Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.

Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

Símbolos

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



Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Producto sanitario para diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Número de lote



Número de material



Contiene



Número

Rn

"R" significa revisión del manual y "n" es el número de revisión



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso



Precaución

Información de contacto

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

Apéndice 1: protocolo manual del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

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

Información general

- Para conocer los materiales necesarios, consulte el apartado Materiales requeridos pero no suministrados.
- Para obtener instrucciones sobre la preparación y la disposición de las muestras, consulte los apartados Protocolo: valoración de las muestras de ADN y Protocolo: detección de las mutaciones de KRAS.

Protocolo: creación de un perfil de temperatura

Antes de empezar, cree un perfil de temperatura para el análisis de KRAS. Los parámetros de ciclado son los mismos para la valoración de muestras y la valoración de la mutación.

Procedimiento

En la tabla 23 se muestran los parámetros de ciclado.

Tabla 23. Parámetros de ciclado

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

1. Haga doble clic en el icono del software Rotor-Gene Q, versión 2.3, situado en el escritorio del portátil conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Seleccione la pestaña "Advanced" (Avanzado) dentro de la ventana Nueva serie que se muestra.

2. Para crear un nuevo molde, seleccione Empty Run (Serie vacía) y, luego, haga clic en New (Nueva) para acceder al New Run Wizard (Asistente para series nuevas).
3. Seleccione 72-Well Rotor (Rotor de 72 pocillos) como tipo de rotor. Confirme que el anillo de fijación esté sujeto y marque la casilla Locking Ring Attached (Anillo de fijación sujeto). Haga clic en Next (Siguiete) (figura 21).

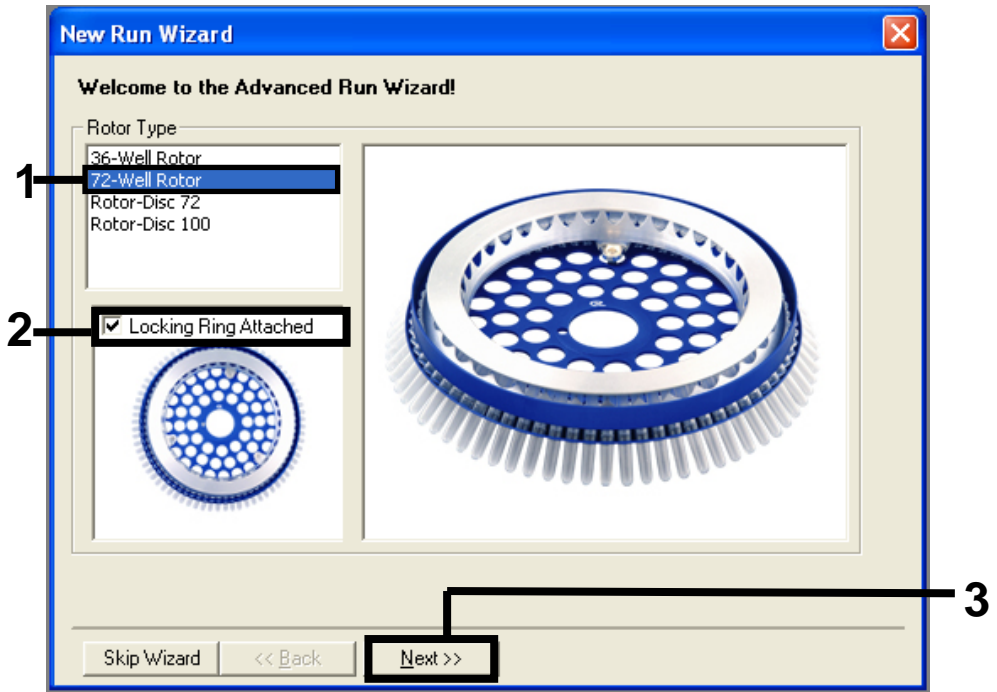


Figura 21. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas). 1 = "Rotor type" (Tipo de rotor), 2 = casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de fijación sujeto), 3 = "Next" (Siguiete).

4. Introduzca el nombre del usuario. Añada las notas que desee e introduzca el volumen de reacción como 25. Asegúrese de que el campo Sample Layout (Disposición de muestras) incluye el valor 1, 2, 3.... Haga clic en Next (Siguiete) (figura 22).

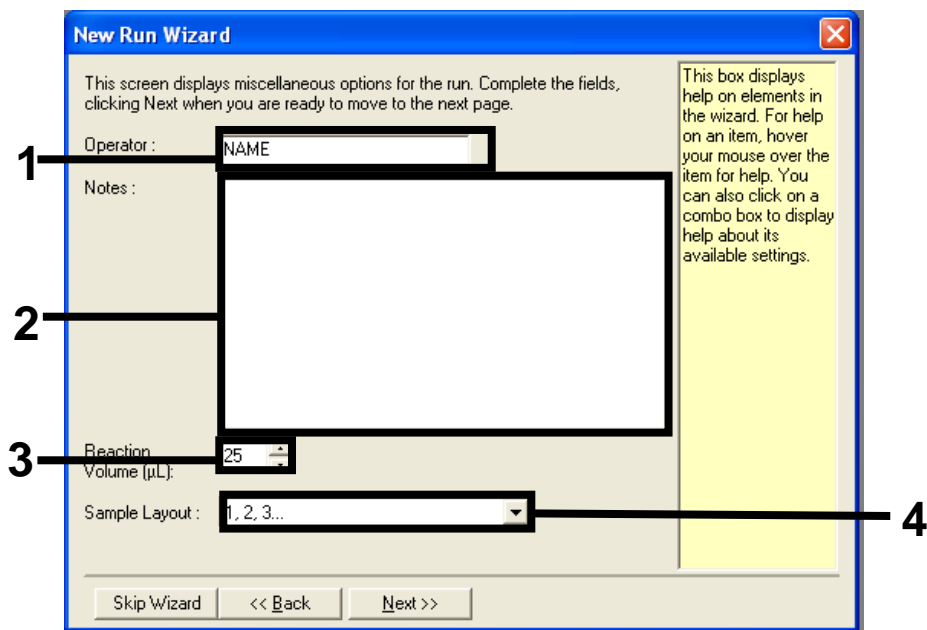


Figura 22. Introducción del nombre del usuario y los volúmenes de reacción. 1 = campo de diálogo "Operator" (Usuario), 2 = campo de diálogo "Notes" (Notas), 3 = campo "Reaction Volume" (Volumen de reacción), 4 = "Sample Layout" (Disposición de muestras), 5 = "Next" (Siguiente).

5. Haga clic en Edit Profile (Editar perfil) situado en la ventana "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) (figura 23) y siga la información de los pasos siguientes para programar el perfil de temperatura.

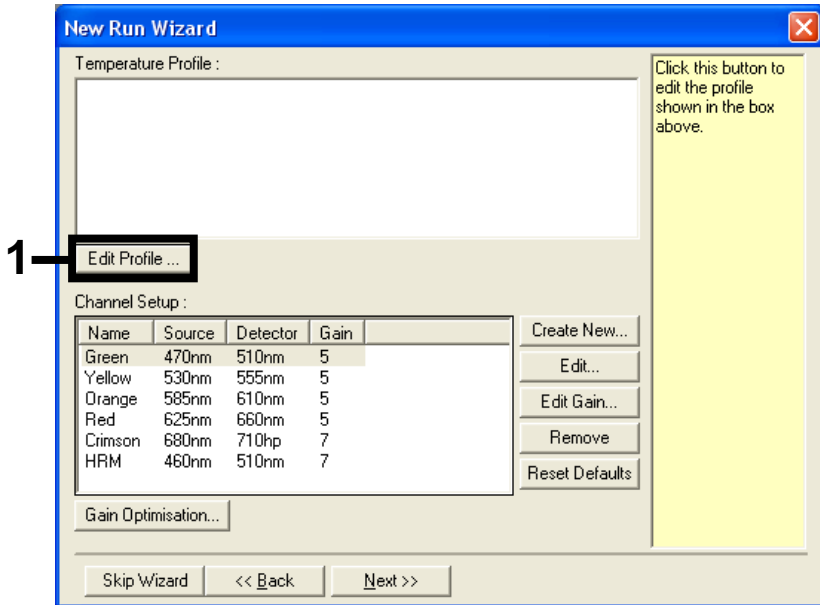


Figura 23. Edición del perfil.

6. Haga clic en Insert after (Insertar después) y seleccione New Hold at Temperature (Nueva fase de temperatura) (figura 24).

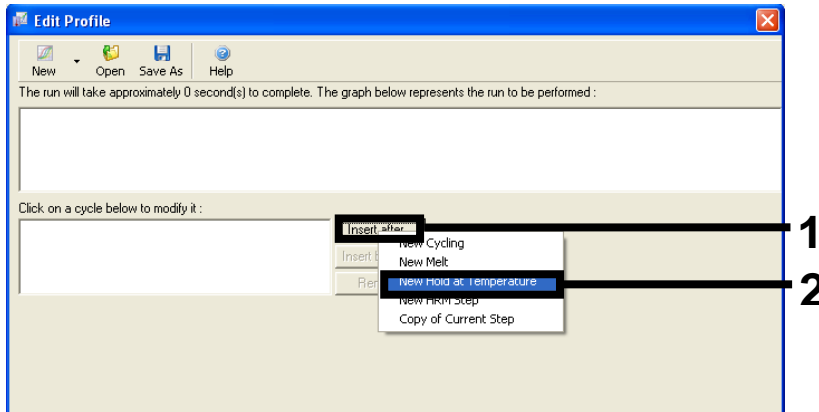


Figura 24. Inserción de un paso de incubación inicial. 1 = "Insert after" (Insertar después), 2 = "New Hold at Temperature" (Nueva fase de temperatura).

7. Ajuste el valor del campo Hold Temperature (Mantener temperatura) en 95°C y Hold Time (Tiempo de retención) en 15 mins 0 secs (15 min 0 s). Haga clic en Insert After (Insertar después) y seleccione New Cycling (Ciclos nuevos) (figura 25).

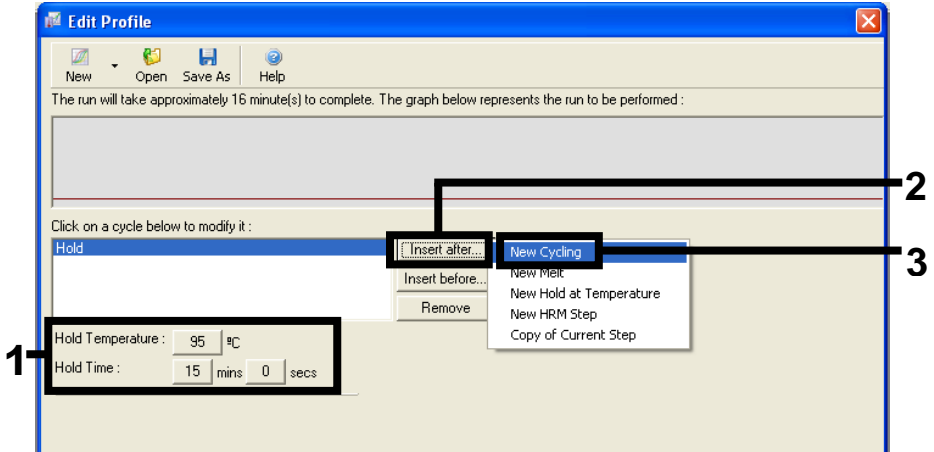


Figura 25. Paso de incubación inicial a 95 °C. 1 = "Hold Temperature" (Mantener temperatura) y "Hold Time" (Tiempo de retención), 2 = "Insert after" (Insertar después), 3 = "New Cycling" (Ciclos nuevos).

8. Ajuste el número de repeticiones de ciclo en 40. Seleccione el primer paso y establezca el valor en 95°C for 30 secs (95 °C durante 30 s) (figura 26).

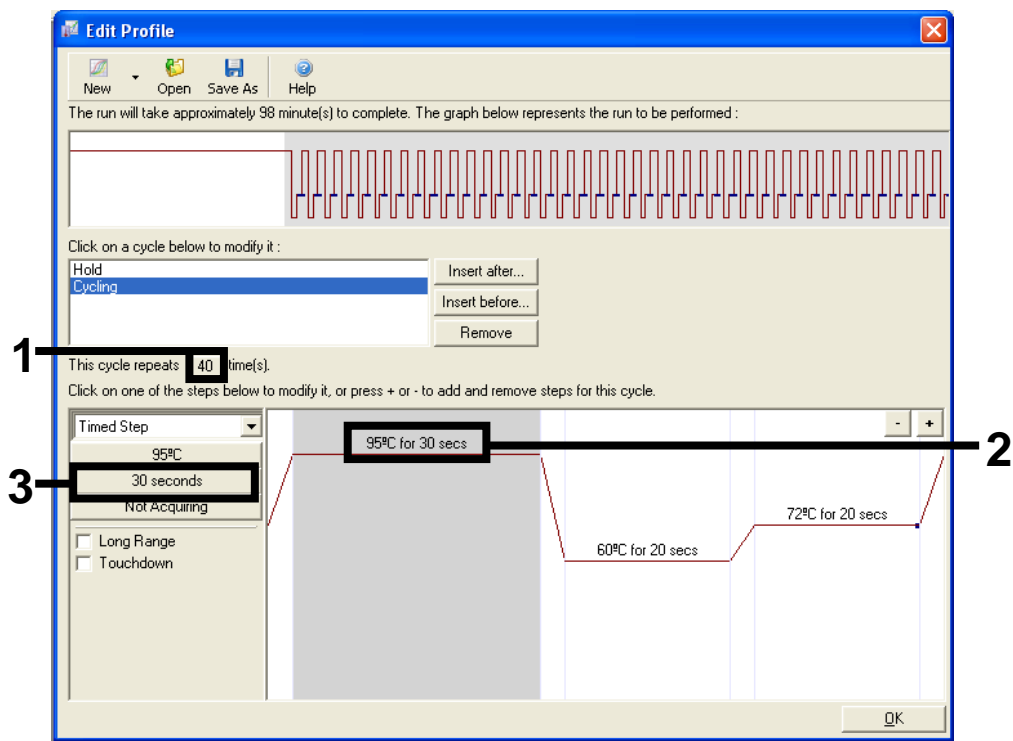


Figura 26. Paso de ciclado a 95 °C. 1 = casilla "Cycle repeats" (Repeticiones de ciclo), 2 = paso uno: ajuste de temperatura, 3 = paso uno: ajuste de tiempo.

9. Seleccione el segundo paso y establezca el valor en 60°C for 60 secs (60 °C durante 60 s). Para activar la adquisición de datos durante este paso, haga clic en Not Acquiring (No adquirir) (figura 27).

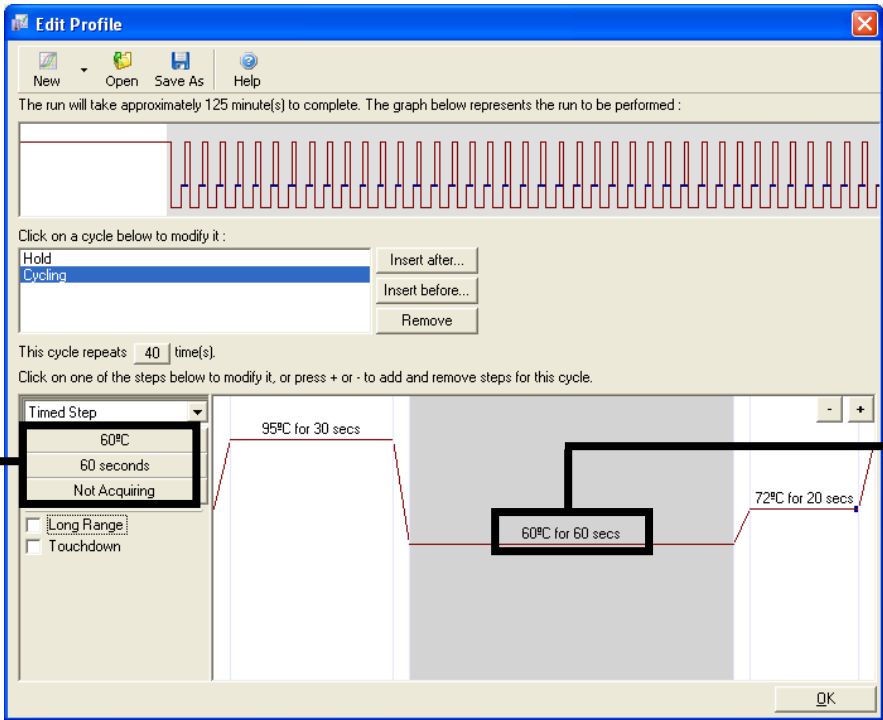


Figura 27. Paso de ciclado a 60 °C. 1 = paso dos: ajuste de temperatura y tiempo, 2 = Not Acquiring (No adquirir).

10. En la lista Available Channels (Canales disponibles), seleccione Green y Yellow y, luego, haga clic en > para desplazarlos a la lista Acquiring Channels (Canales de adquisición). Haga clic en OK (Aceptar) (figura 28).

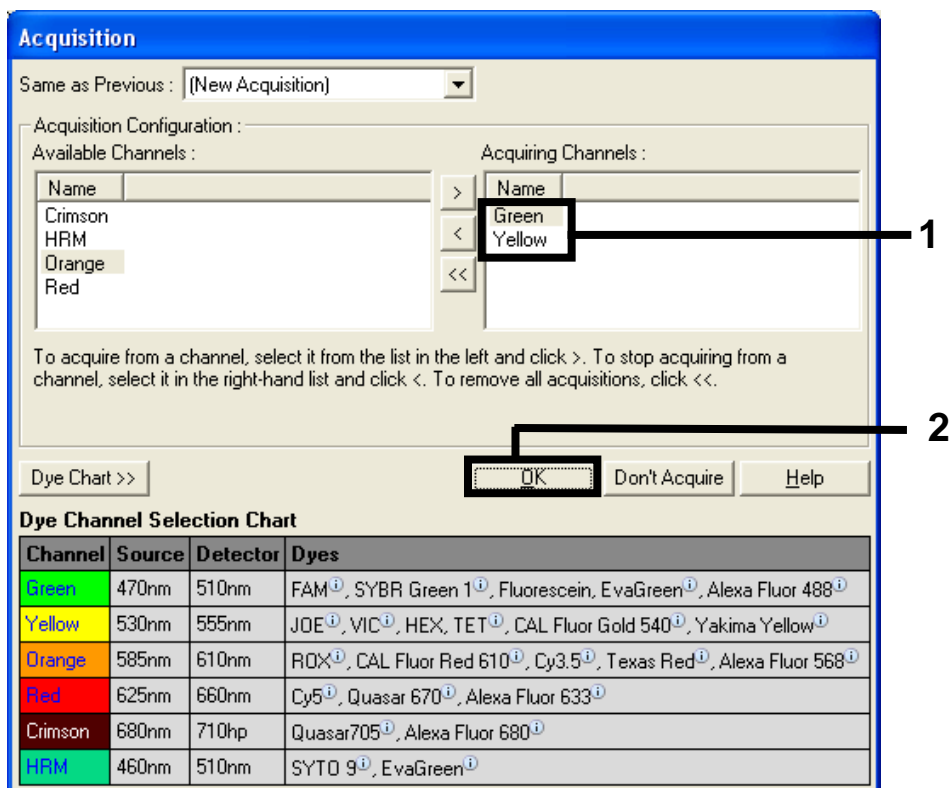


Figura 28. Adquisición en el paso de ciclado a 60 °C.

11. Seleccione el tercer paso y haga clic en- para eliminarlo. Haga clic en OK (Aceptar) (figura 29).

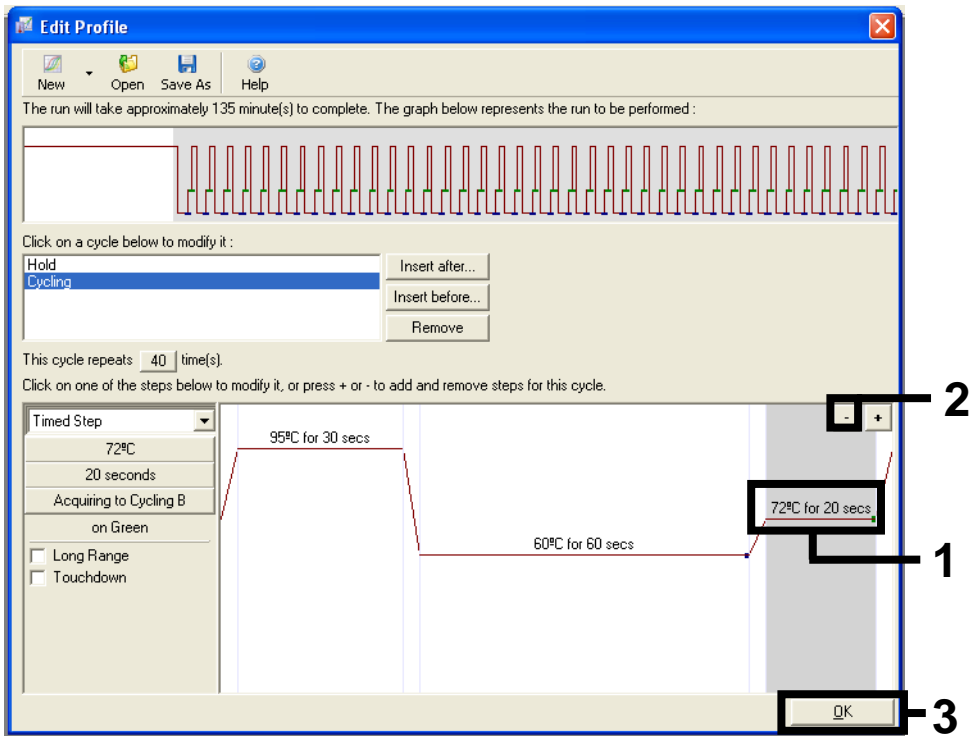


Figura 29. Eliminación del paso de extensión.

12. En la ventana siguiente, haga clic en Gain Optimisation (Optimización de ganancia) (figura 30).

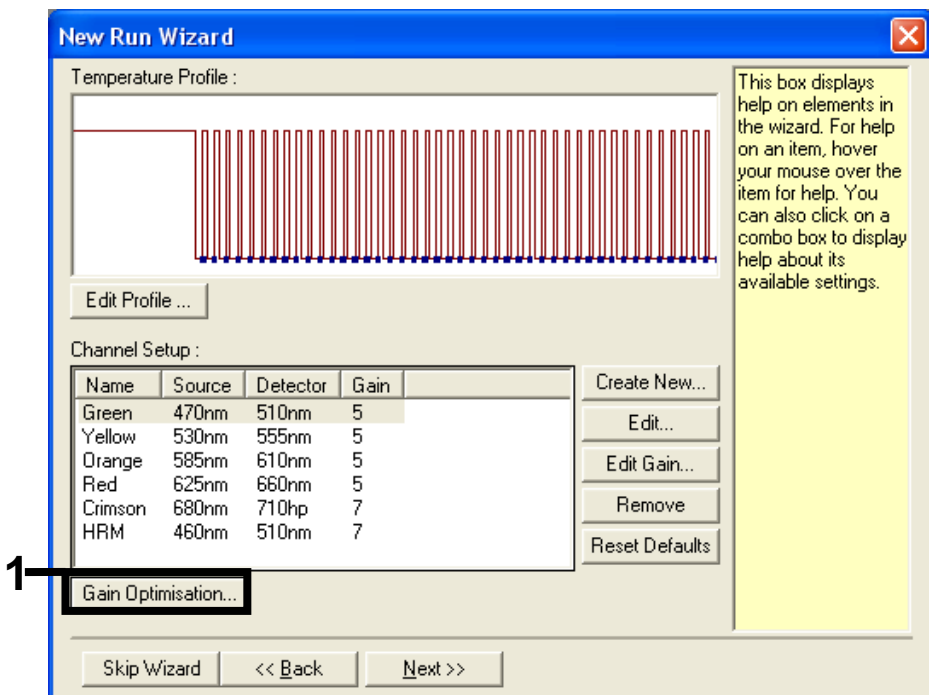


Figura 30. "Gain Optimisation" (Optimización de ganancia).

- Haga clic en Optimize Acquiring (Optimizar adquisición). Para cada canal, se muestra la configuración de canal. Haga clic en OK (Aceptar) para aceptar estos valores predeterminados. (Figura 31).

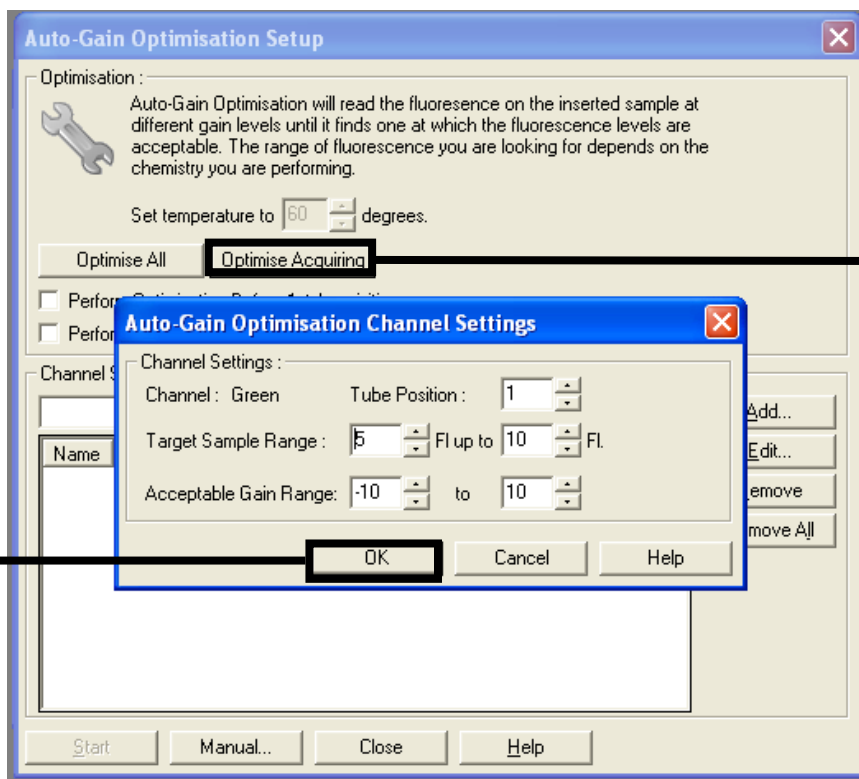


Figura 31. "Auto-gain Optimisation" (Optimización de la ganancia automática) para el canal verde.

14. Active la casilla Perform Optimisation before 1st Acquisition (Ejecutar la optimización antes de la primera adquisición) y, a continuación, haga clic en Close (Cerrar) para volver al asistente (figura 32).

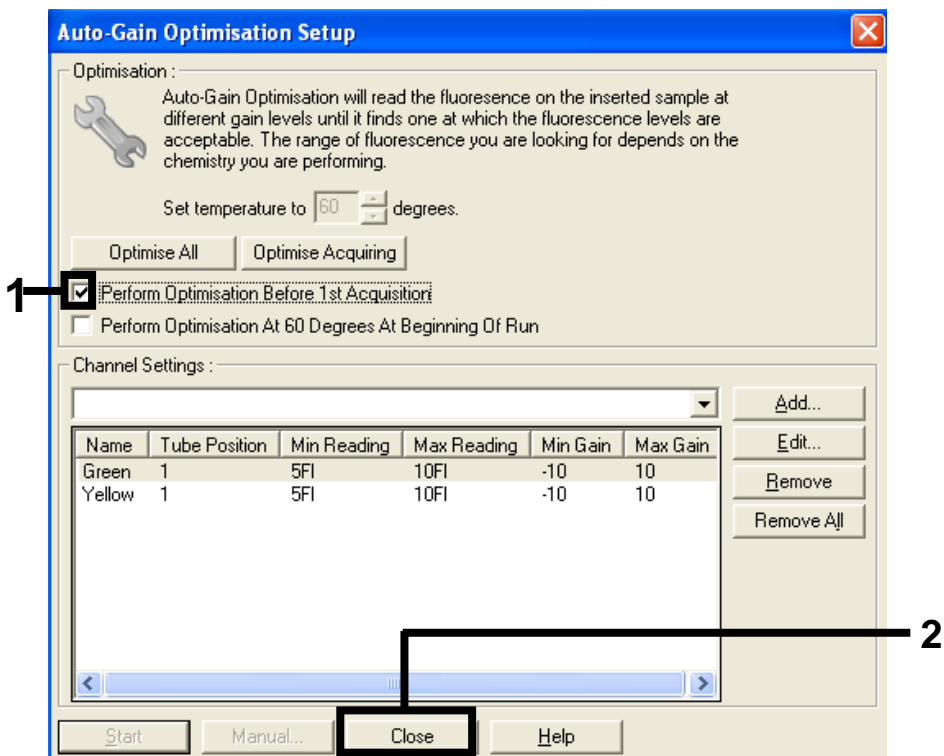


Figura 32. Selección de los canales verde y amarillo.

15. Haga clic en Next (Siguiente). A continuación, haga clic en Save (Guardar) para guardar el molde en la ubicación correspondiente.

Protocolo: valoración de las muestras (manual)

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

- Prepare las muestras tal como se describe en el apartado Protocolo: valoración de las muestras de ADN.

- Configure la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tal como se describe en el apartado Protocolo: configuración de *therascreen* KRAS RGQ PCR.
- Una vez finalizada la serie, analice los datos según las instrucciones del apartado Análisis de los datos de valoración de las muestras.

Protocolo: detección de mutaciones de KRAS (manual)

Cuando una muestra es correcta según la evaluación de muestras, se puede analizar para detectar mutaciones de KRAS.

- Prepare las muestras tal como se describe en el apartado Protocolo: detección de las mutaciones de KRAS.
- Configure la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tal como se describe en el apartado Protocolo: configuración de *therascreen* KRAS RGQ PCR.
- Una vez finalizada la serie, analice los datos según las instrucciones del apartado Análisis de la detección de mutaciones del gen KRAS.

Protocolo: configuración de *therascreen* KRAS RGQ PCR

1. Abra el software Rotor-Gene Q versión 2.3. y el perfil de temperatura creado apropiado.
2. Cree el perfil de temperatura según el protocolo: creación de un perfil de temperatura. Asegúrese de seleccionar el rotor correcto y marque la casilla Locking Ring Attached (Anillo de fijación sujeto). Haga clic en Next (Siguiente) (figura 33).

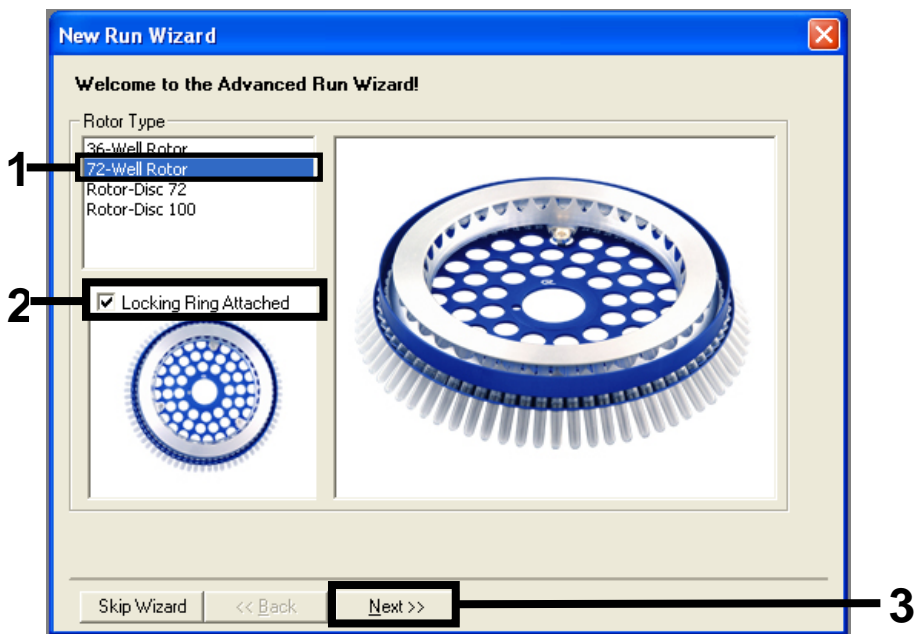


Figura 33. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) y pantalla de inicio.

1 = Rotor type (Tipo de rotor), 2 = casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de fijación sujeto), 3 = "Next" (Siguiente).

3. Introduzca el nombre del usuario. Añada las notas que desee y compruebe que el campo Reaction Volume (Volumen de reacción) esté configurado en 25 y que el campo Sample Layout (Disposición de muestras) incluya los valores 1, 2, 3.... Haga clic en Next (Siguiente) (figura 34).

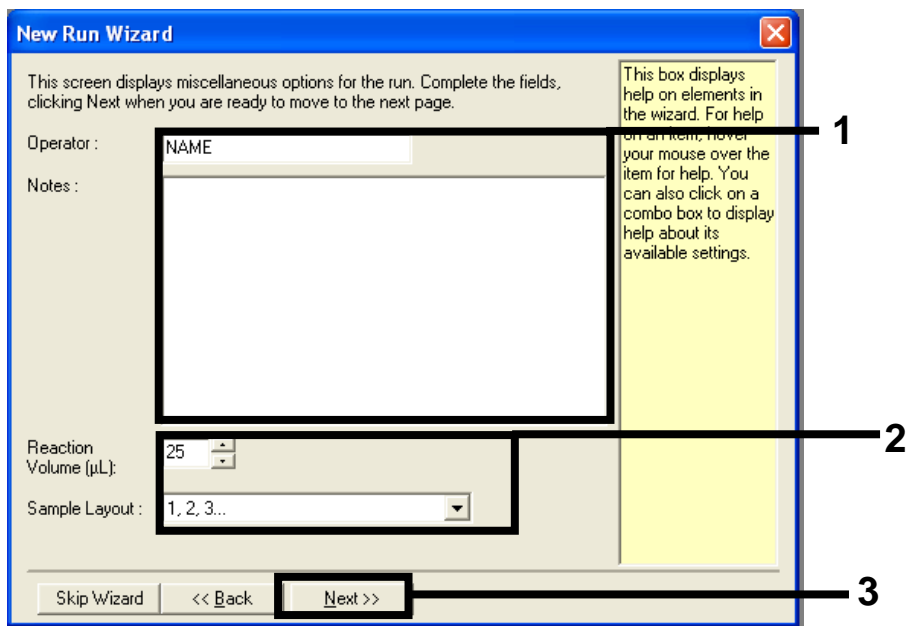


Figura 34. Cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas). 1 = campos “Operator” (Usuario) y “Notes” (Notas), 2 = campos “Reaction Volume” (Volumen de reacción) y “Sample Layout” (Disposición de muestras), 3 = “Next” (Siguiete).

4. Deje todos los valores como aparecen en la ventana siguiente. No es necesario editar si el perfil de temperatura se ha creado según las instrucciones del protocolo: creación de un perfil de temperatura. Haga clic en Next (Siguiete) (figura 35).

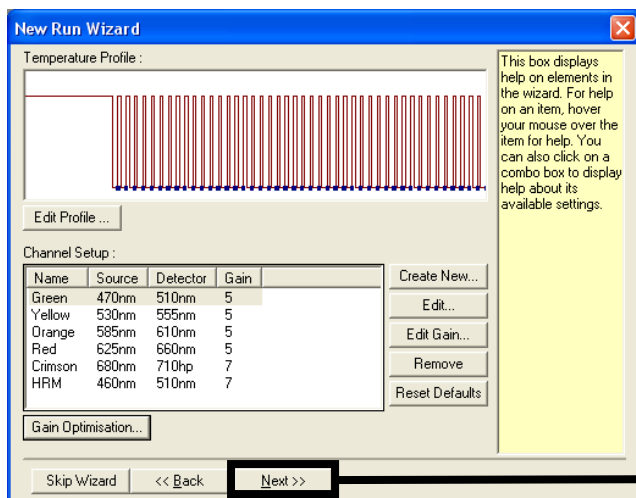


Figura 35. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) y pantalla de edición de temperatura. 1 = "Next" (Siguiete).

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

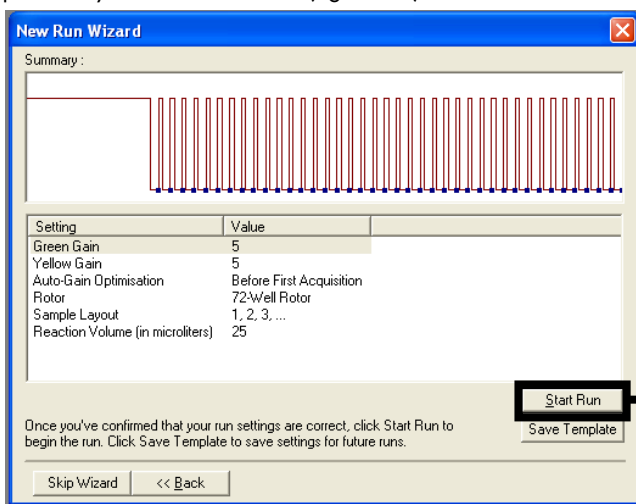


Figura 36. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas). 1 = "Start Run" (Iniciar la serie).

Nota: Una vez iniciada la serie, aparece una nueva ventana en la que puede introducir nombres de muestra en ese momento o bien, hacer clic en Finish (Finalizar) e introducirlos más tarde seleccionando el botón Sample (Muestra) durante la ejecución de la serie o una vez completada.

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

Nota: Al introducir el nombre de las muestras, los pocillos vacíos deben dejarse en blanco en la columna "Name" (Nombre).

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

Interpretación de los resultados (manual)

Una vez completada la serie de valoración o la serie del análisis de mutación, debe analizar los datos según el siguiente procedimiento.

Configuración del análisis del software

1. Utilice el software Rotor-Gene Q (2.3) para abrir el archivo adecuado.
2. Si no ha introducido el nombre de las muestras antes de realizar la serie, haga clic en Edit Samples (Editar muestras).
3. Introduzca los nombres de las muestras en la columna Name (Nombre).
4. Haga clic en Analysis (Análisis). En la página de análisis, haga clic en Cycling A. Yellow para ver el canal HEX.
5. Haga clic en Named On (Con nombre).
Nota: Esto permite asegurarse de que los pocillos vacíos no se incluyen en el análisis.
6. Seleccione la opción Dynamic Tube (Tubo dinámico).
7. Seleccione Linear Scale (Escala lineal).
8. Haga clic en Outlier Removal (Eliminación de valores atípicos) e introduzca 10% en el campo NTC Threshold (Umbral de NTC).
9. Configure el umbral en 0.05 (0,05) y compruebe los valores de CT de HEX.
10. En la página de análisis, haga clic en Cycling A. Green para ver el canal FAM.
11. Compruebe que la opción Dynamic Tube (Tubo dinámico) esté seleccionada. Haga clic en Linear Scale (Escala lineal).
12. Haga clic en Outlier Removal (Eliminación de valores atípicos) e introduzca 10% en el campo NTC Threshold (Umbral de NTC).
13. Configure el umbral en 0.05 (0,05) y compruebe los valores de CT de FAM.

Análisis de los datos de valoración de las muestras

Análisis de control de la serie

Consulte el organigrama de “Análisis de control de la serie” en la figura 37.

- **Control negativo:** para asegurarse de que la mezcla de reacción no está contaminada, el control sin molde no debe generar un valor de C_T en el canal verde por debajo de 40. Para garantizar que la placa se ha configurado correctamente, el control sin molde debe mostrar una amplificación de 31,91-35,16 en el canal amarillo. Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos).
- **Control positivo:** el control positivo (Positive Control, PC) de KRAS debe generar un valor de C_T de 23,5-29,5 en el canal verde en cada uno de los 8 ensayos. Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos). La aparición de un valor fuera de este intervalo indica un problema de configuración del ensayo y es, por lo tanto, un fallo de la serie.

Nota: No deben utilizarse los datos de las muestras si alguno de estos dos controles de análisis da error.

Siempre que ambos controles de series sean válidos, cada valor de C_T de muestra debe estar comprendido en el intervalo 21,92-32,00 en el canal verde. Si la muestra se encuentra fuera de este intervalo, se proporciona la guía siguiente.

Análisis de la muestra: ensayo de control

- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra <21,92:** las muestras con un valor de C_T de control <21,92 se deben diluir, ya que este valor representa el nivel inferior del intervalo de ensayo validado. Para detectar cada mutación en un nivel bajo, las muestras sobreconcentradas se deben diluir para que se encuentren en el intervalo mencionado anteriormente, partiendo de la base de que diluir a la mitad aumentará el valor de C_T en 1. Si el valor de la muestra está cerca de 21,92, se recomienda diluir a fin de garantizar la obtención de un resultado de la serie de análisis de muestras (detección de mutaciones de KRAS). Es necesario diluir las muestras con el agua suministrada con el kit (agua exenta de nucleasas para la dilución [Dil.]).

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra >32 : se recomienda volver a extraer la muestra, ya que el ADN molde inicial presente no será suficiente para detectar todas las mutaciones con los valores de corte indicados del ensayo.

Análisis de la detección de mutaciones del gen KRAS

Análisis de control de la serie

Consulte el organigrama de “Análisis de control de la serie” (figura 37).

- Control negativo: para asegurarse de que la mezcla de reacción no está contaminada, el control sin molde no debe generar un valor de C_T en el canal verde por debajo de 40. Para garantizar que la placa se ha configurado correctamente, el control sin molde debe mostrar una amplificación de 31,91-35,16 en el canal amarillo. Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos).
- Control positivo: el control positivo (Positive Control, PC) de KRAS debe generar un valor de C_T de 23,5-29,5 en el canal verde en cada uno de los 8 ensayos. Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos). La aparición de un valor fuera de este intervalo indica un problema de configuración del ensayo y es, por lo tanto, un fallo de la serie.

Nota: No deben utilizarse los datos de las muestras si alguno de estos 2 controles de análisis da error.

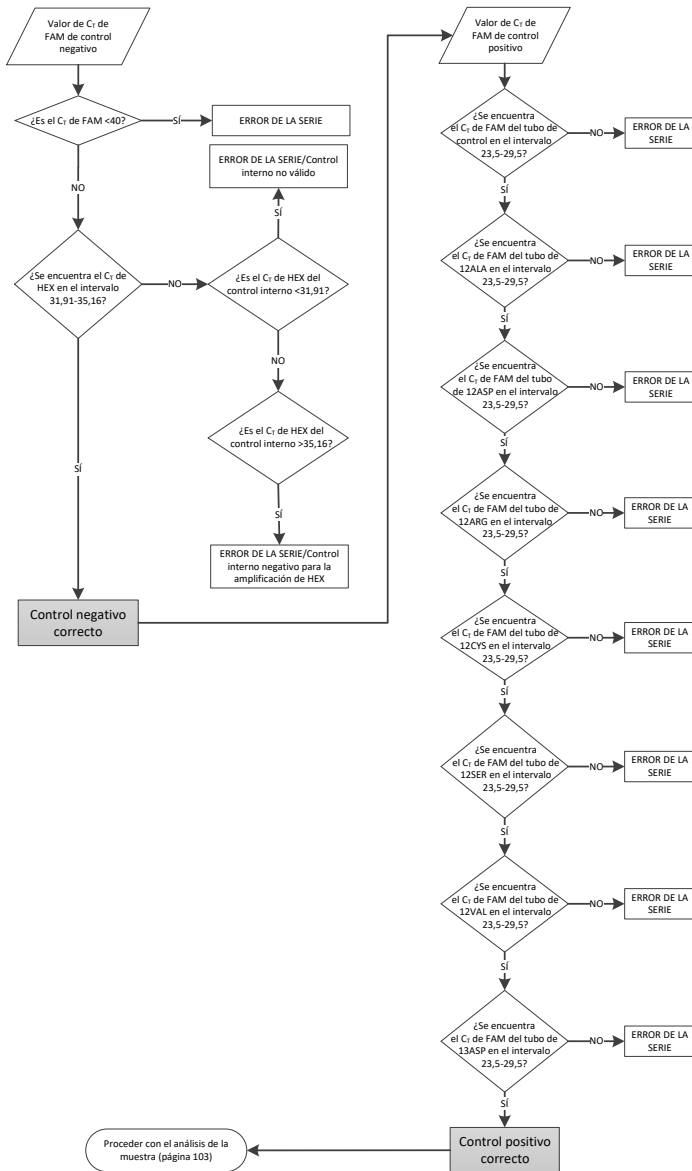


Figura 37. Organigrama del análisis de control de la serie.

Análisis de la muestra

Consulte el organigrama de “Análisis de la muestra” en la figura 38.

Valor de C_T de FAM de control de la muestra

Siempre que ambos controles de series sean válidos para el ensayo de control, cada valor de C_T de control de la muestra debe estar comprendido en el intervalo de 21,92-32,00 en el canal verde.

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

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra <21,92: las muestras con un valor de C_T de control de <21,92 sobrecargarán los ensayos de mutación y deben diluirse. Para detectar cada mutación en un nivel bajo, las muestras sobreconcentradas se deben diluir para que se encuentren en el intervalo mencionado anteriormente, partiendo de la base de que diluir a la mitad aumentará el valor de C_T en 1. Es necesario diluir las muestras con el agua suministrada con el kit (agua exenta de nucleasas para la dilución [Dil.]).
- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra >32: interprete con precaución los datos, ya que es posible que no se hayan detectado las mutaciones de nivel muy bajo.

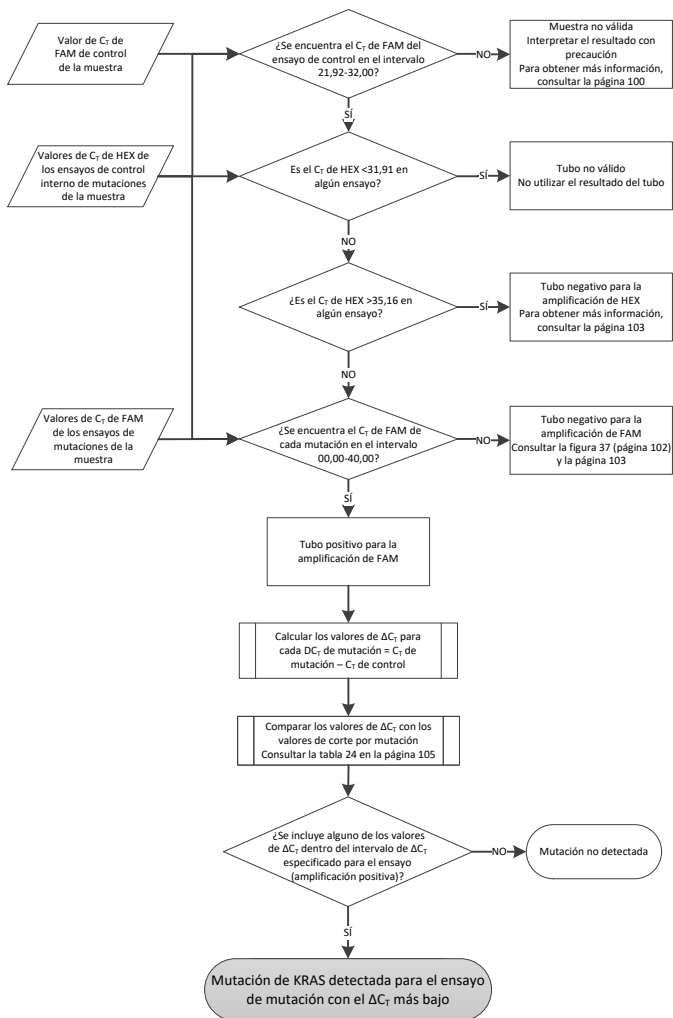


Figura 38. Organigrama del análisis de la muestra.

Valor de CT de HEX de los ensayos de control interno de mutaciones de la muestra

Consulte el organigrama de “Análisis de la muestra” en la figura 38.

Es necesario analizar todos los pocillos de cada muestra. Compruebe que cada pocillo genere una señal HEX del control interno. Existen 3 resultados posibles.

- Si el valor de C_T del control interno se encuentra dentro del intervalo especificado (31,91-35,16), la amplificación de HEX es positiva.
- Si el valor de C_T del control interno está por encima del intervalo especificado (>35,16), la amplificación de HEX es negativa.
- Si el valor de C_T del control interno está por debajo del intervalo especificado (<31,91), el resultado no es válido.

Si el error del control interno se debe a una inhibición de PCR, diluir la muestra podría reducir el efecto de los inhibidores, pero debe tenerse en cuenta que esto también diluiría el ADN diana. El kit incluye un tubo de agua para la dilución de la muestra (Dil.).

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

Es necesario comparar los valores de FAM de las 7 mezclas de reacción con los valores que se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Valores de reacción de mutación de muestras aceptables (FAM)*

Ensayo	Intervalo de C_T aceptable	Intervalo de ΔC_T
12ALA	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12ASP	0,00-40,00	$\leq 6,60$
12ARG	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12CYS	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12SER	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12VAL	0,00-40,00	$\leq 7,50$
13ASP	0,00-40,00	$\leq 7,50$

* Los valores aceptables son los comprendidos entre los valores mostrados (también aceptables).

- Si el valor de C_T de FAM se encuentra dentro del intervalo especificado, la amplificación de FAM es positiva.
- Si el valor de C_T de FAM está por encima del intervalo especificado o si no existe amplificación, la amplificación de FAM es negativa.

Proceda a calcular el valor de ΔC_T de todos los tubos de mutación que presenten amplificación de FAM positiva tal y como se indica a continuación. Es importante utilizar los valores de C_T de mutación y de control de una misma muestra.

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

Compare el valor de ΔC_T de la muestra con el punto de corte del ensayo en cuestión (tabla 24). Compruebe que se aplique el punto de corte correcto para cada ensayo.

El punto de corte es el punto a partir del que una señal positiva podría ser la respuesta a una señal de fondo del primer ARMS en ADN nativo. Si el valor de ΔC_T de la muestra es superior al punto de corte, esta se considera negativa o fuera de los límites de detección del kit.

Para cada muestra, las reacciones de mutación recibirán un estado de mutación detectada, mutación no detectada o no válido según los siguientes criterios:

Mutación detectada:

- La amplificación positiva de FAM y el valor de ΔC_T son iguales al valor de corte o están por debajo de él. Si se detectan varias mutaciones, la mutación indicada debe ser la que presente el valor de ΔC_T más bajo.

Mutación no detectada:

- La amplificación positiva de FAM y el valor de ΔC_T están por encima del valor de corte.
- La amplificación de FAM es negativa y la amplificación de HEX (control interno) es positiva.

No válido:

- HEX (control interno) no es válido.
- La amplificación de FAM es negativa y la amplificación de HEX es negativa.

Si una muestra es negativa para la amplificación de HEX en un tubo pero positiva para la amplificación de FAM en un tubo diferente, el resultado de mutación detectada en el tubo diferente todavía puede considerarse válido, pero puede que la mutación particular identificada no se haya asignado con fiabilidad.

- Si una muestra es negativa para la amplificación de HEX y positiva para la amplificación de FAM en el mismo tubo, el resultado de mutación detectada debe considerarse válido.
- Si un tubo no es válido para HEX (control interno), el resultado de dicho tubo no debe utilizarse.

Asignación del estado de mutación de la muestra

Tras evaluar todos los tubos de reacción de mutación, el estado de mutación de la muestra se determina tal y como se indica a continuación:

- **Mutación detectada:** una o más de las 7 reacciones de mutación son positivas. Si se detectan varias mutaciones, la mutación indicada debe ser la que presente el valor de ΔC_T más bajo.
- **Mutación no detectada:** las 7 reacciones de mutación son negativas.
- **No válido:** ninguna reacción de mutación es positiva, y una o más reacciones de mutación son no válidas.

Nota: el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit está diseñado para detectar mutaciones en el gen KRAS en una muestra de ADN. Cuando se identifica una muestra como de mutación de KRAS detectada, solo debe indicarse una mutación específica. Si se detectan varias mutaciones, la mutación indicada debe ser la que presente el valor de ΔC_T más bajo.

Se puede producir reactividad cruzada entre las reacciones de mutación. Por ejemplo, si se observa una mutación de 12ALA de alto nivel, algunas de las reacciones de mutación restantes también podrían obtener un resultado positivo. Esto se debe a que los primers ARMS detectan otras mutaciones de secuencia similar cercanas. Si un segundo ensayo de mutación arroja un resultado positivo, es probable que se trate de reactividad cruzada. Si bien es poco frecuente, se han observado dobles mutantes.

Si una o más de las reacciones de mutación son no válidas pero hay una o más positivas, todavía puede identificarse la muestra como de mutación de KRAS detectada, ya que existe una mutación. No obstante, puede que la mutación específica indicada no sea precisa y se haya obtenido como resultado de la reactividad cruzada. Por lo tanto, la muestra solo se debe identificar como de mutación de KRAS detectada.

Apéndice 2: instalación del software *therascreen* KRAS Assay Package

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se ha diseñado para su uso con el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM con un 72-Well Rotor. El software *therascreen* KRAS Assay Package se encuentra disponible por separado en CD (n.º de referencia 9022641).

El software *therascreen* KRAS Assay Package se puede descargar en la página web de producto del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit correspondiente, en www.qiagen.com. Encontrará la información de descarga en el apartado "Product Resources" (Recursos de producto), en la pestaña "Supplementary Protocols" (Protocolos complementarios). Los paquetes de ensayo también se pueden solicitar en un CD.

El paquete incluye los moldes "*therascreen* KRAS CE QC Locked Template" y "*therascreen* KRAS CE Locked Template".

Nota: El software *therascreen* KRAS Assay Package versión 3.1.1 (QIAGEN, n.º de referencia 9023675) solamente funcionará con el software Rotor-Gene Q versión 2.3 correspondiente. Compruebe que se haya instalado la versión correcta del software Rotor-Gene Q antes de proceder a instalar el software *therascreen* KRAS Assay Package.

Procedimiento (descarga)

1. Descargue el software *therascreen* KRAS RGQ Assay Package en la página web de producto del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit correspondiente, en www.qiagen.com.
2. Abra el archivo comprimido descargado. Para ello, haga doble clic en él y extraiga el archivo que hay en su interior.
3. Haga doble clic en el archivo ejecutable `therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe` para iniciar la instalación.

Procedimiento (CD)

1. Solicite a QIAGEN el CD thetascreen KRAS RGQ Assay Package CE compatible con el software Rotor-Gene Q instalado (consulte más arriba), que se encuentra disponible por separado.

Versión 3.1.1. N.º de referencia 9023675.

2. Introduzca el CD en la unidad correspondiente del ordenador portátil conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

3. Haga doble clic en el archivo ejecutable thetascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe o thetascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe para iniciar la instalación.

Se abrirá el asistente para la instalación.

4. Haga clic en Next (Siguiete) para continuar (figura 39).



Figura 39. Cuadro de diálogo "Setup" (Configuración). 1 = "Next" (Siguiete).

5. Lea el Acuerdo de licencia en el cuadro de diálogo "License Agreement" (Acuerdo de licencia) y marque la casilla I accept the agreement (Acepto el acuerdo). Haga clic en Next (Siguiente) para continuar (figura 40).

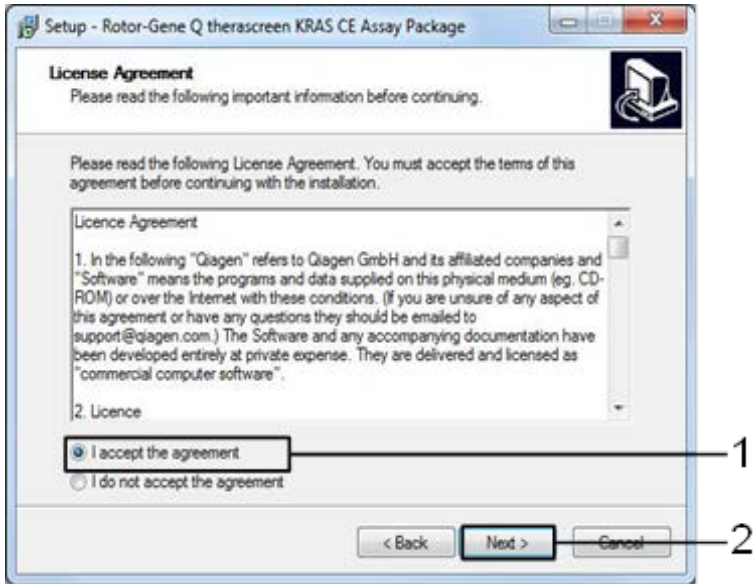


Figura 40. Cuadro de diálogo "License Agreement" (Acuerdo de licencia). 1 = declaración "I accept the agreement" (Acepto el acuerdo), 2 = "Next" (Siguiente).

La configuración de los moldes se iniciará automáticamente.

6. En la última ventana de configuración, haga clic en Finish (Finalizar) para salir del asistente de configuración. (Figura 41).

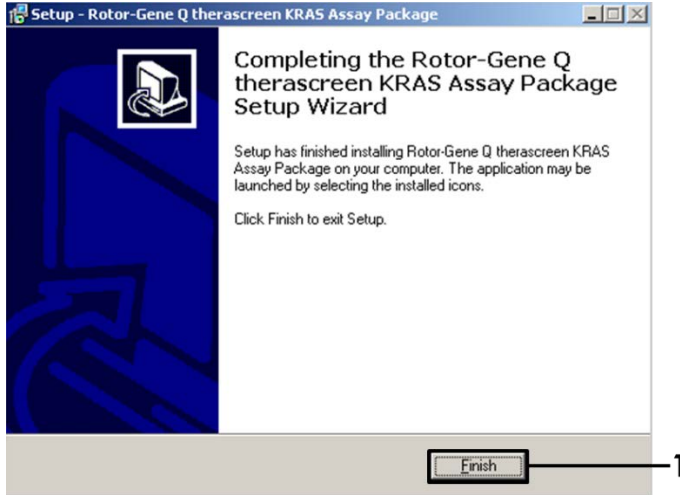


Figura 41. Finalización del asistente.

7. Reinicie el ordenador. El asistente generará automáticamente accesos directos a los moldes "therascreen KRAS QC Locked Template" (Molde bloqueado de CC para KRAS de therascreen) y "therascreen KRAS Locked Template" (Molde bloqueado para KRAS de therascreen) y los colocará en el escritorio.

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de referencia
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: 1 ensayo de control, 7 ensayos de mutación, control positivo, agua, <i>Taq</i> ADN polimerasa	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (version 3.1.1)	Paquete de software de protocolos para el <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit y los equipos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM de QIAGEN con un 72-Well Rotor	9023675
Rotor-Gene Q y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Termociclador para real-time PCR y analizador de High Resolution Melt (disociación de alta resolución, HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002032

Producto	Contenido	N.º de referencia
Rotor-Gene Q MDx	Termociclador para real-time PCR y analizador de High Resolution Melt (disociación de alta resolución, HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033
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
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapones para 1000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapones para 10 000 reacciones	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, para la purificación de ADN genómico obtenido de tejidos impregnados en parafina		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: columnas QIAamp MinElute®, proteinasa K, tampones y Collection Tubes (2 ml)	56404

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 o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Historial de revisiones del documento

Fecha	Cambios
R4, enero de 2019	<p>Se ha añadido Representante autorizado (cubierta frontal)</p> <p>Se ha actualizado el apartado de Símbolos</p> <p>Se ha actualizado la plantilla</p>
R5, noviembre de 2019	<p>Se ha cambiado el fabricante legal (portada)</p> <p>Se ha eliminado el símbolo EC + REP de la portada y del apartado de Símbolos</p> <p>Se ha cambiado el nombre del equipo de Rotor-Gene Q MDx a Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, para adaptarse al nombre de la etiqueta del equipo</p> <p>Se ha actualizado el protocolo Detección de mutaciones de KRAS para incluir el paso adicional en la preparación de mezclas maestras</p> <p>Se han corregido los valores de las columnas de Frecuencia e Intervalo de confianza del 95 %, en la tabla 9.</p> <p>Se ha actualizado el porcentaje de concordancia global de CRC de 96,4 % a 96,82 %</p> <p>Se han corregido los valores de la columna de C₉₅ de LoD, en la tabla 14</p>

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Acuerdo de licencia limitada para el *therascreen* KRAS RQG 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 kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual y los protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales los han proporcionado 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 kit y su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit 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 kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan 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 costes judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit o con sus componentes.

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

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (Grupo QIAGEN); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc. que se utilizan en este documento, aunque no aparezcan marcados como tales, están protegidos por la ley.

No debe utilizarse con muestras de heces.

No debe utilizarse con muestras de orina.

No debe utilizarse con ácido nucleico extracelular de muestras de sangre.

No debe utilizarse con muestras de médula ósea acelular.

No debe utilizarse con muestras de saliva.

LA COMPRA DE ESTE PRODUCTO OTORGA AL COMPRADOR DERECHOS DE DETERMINADAS PATENTES DE ROCHE PARA USO EXCLUSIVO DE SERVICIOS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO PARA PERSONAS. POR LA PRESENTE NO SE OTORGA NINGUNA PATENTE GENERAL NI OTRA LICENCIA DE NINGÚN TIPO, DISTINTA DE ESTE DERECHO ESPECÍFICO DE USO DERIVADO DE LA COMPRA.

1119793 HB-1861-005 11-2019 © 2019 QIAGEN. Todos los derechos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Servicio técnico support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com