

Mayo 2016

Manual del kit *therascreen*[®] RAS Extension Pyro[®]



Versión 1

IVD

Para uso de diagnóstico in vitro

Para la detección de mutaciones en los exones 3 y 4 del oncogén KRAS humano y en los exones 2, 3 y 4 del oncogén NRAS humano

CE

REF

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, ALEMANIA

R2 **MAT**

1085873ES



Contenido

Uso previsto	5
Resumen y explicación	5
Principio del procedimiento	7
Controles	8
Materiales suministrados	9
Contenido del kit	9
Materiales requeridos pero no suministrados	12
Advertencias y precauciones.....	15
Precauciones generales	15
Almacenamiento y manipulación de reactivos.....	16
Obtención y preparación de muestras para el análisis y almacenamiento de las mismas ..	17
Procedimiento	19
Aislamiento de ADN	19
Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24	19
Protocolo 2: Ejecución de la PCR con los reactivos para PCR suministrados con el kit <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro	22
Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance	26
Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24	29
Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24	34
Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24	36
Interpretación de los resultados	42

Resultados representativos	47
Guía de resolución de problemas	50
Control de calidad	52
Limitaciones	52
Características de rendimiento	53
Límite de blanco y límite de detección	53
Mutaciones GGT > TGT y GGT > GTT en el codón 13 de NRAS	55
Linealidad	56
Precisión	57
Evaluación diagnóstica	60
Referencias	65
Símbolos	65
Información de contacto	66
Apéndice A: Configuración de los ensayos <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro	67
Apéndice B: Vaciado del contenedor de residuos y los contenedores	73
Información para pedidos	75

Uso previsto

El kit *therascreen* RAS Extension Pyro es un ensayo de diagnóstico *in vitro* basado en la tecnología Pyrosequencing® para la detección cuantitativa de mutaciones en los codones 59, 61, 117 y 146 del oncogén KRAS humano y en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 del oncogén NRAS humano mediante ADN extraído de tejido humano con cáncer colorrectal metastásico (CRCm) fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE).

El kit *therascreen* RAS Extension Pyro tiene como finalidad la identificación de los pacientes de CRCm con más probabilidades de beneficiarse de terapias por inhibición del EGFR como Cetuximab y Panitumumab (1).

El kit *therascreen* RAS Extension Pyro solamente se utiliza en el sistema PyroMark® Q24. El sistema PyroMark Q24 incluye:

- El instrumento PyroMark Q24 o el instrumento PyroMark Q24 MDx
- La estación de vacío PyroMark Q24 o la estación de vacío PyroMark Q24 MDx
- El software PyroMark Q24 (versión 2.0) o software PyroMark Q24 MDx (versión 2.0)

El kit *therascreen* RAS Extension Pyro está destinado a usuarios profesionales, como técnicos y médicos expertos en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*, en técnicas de biología molecular y en el sistema PyroMark Q24.

Resumen y explicación

The *therascreen* RAS Extension Pyro Kit is used for quantitative measurements of mutations in exons 3 and 4 of the human KRAS gene, and exons 2, 3, and 4 of the human NRAS gene. The kit consists of eight assays (Ilustración 1)

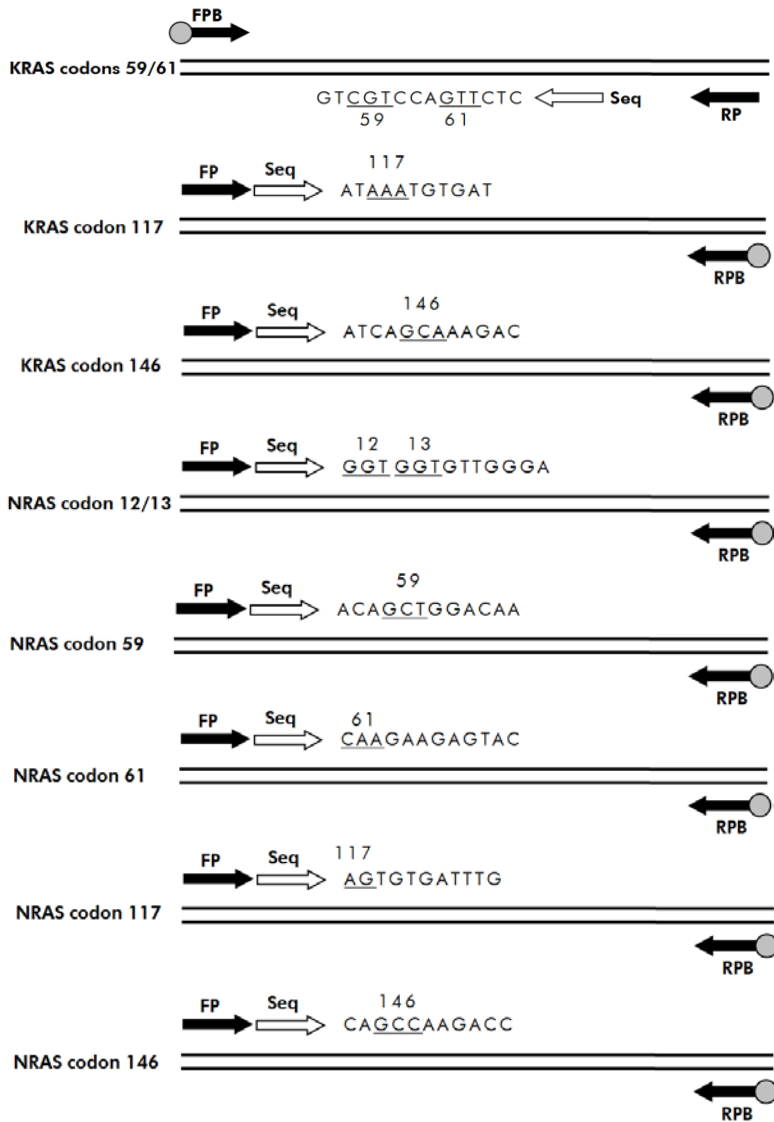


Ilustración 1. Ensayos del kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Las 8 regiones se amplifican por separado mediante la técnica de PCR y posteriormente se procede a la secuenciación de la región definida. Las mutaciones de la región cubierta generarán distintos patrones en la gráfica Pyrogram®. Dichos patrones son distintos a los de las gráficas obtenidas a partir de las muestras nativas. Las mutaciones que se pueden analizar con el software PyroMark Q24 se incluyen en la Tabla 15 (Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* RAS Extension Pyro). Los ensayos para los codones 117 y 146 de KRAS y los codones 12/13, 59, 61, 117 y 146 de NRAS se realizan con secuenciación directa, mientras que el ensayo para el codón 59/61 de KRAS se secuencia en sentido inverso. El producto incluye una mezcla de primers de PCR y un primer de secuenciación para cada ensayo. Los primers se suministran en forma de solución y cada vial contiene 24 µl de primer o mezcla de primers.

Principio del procedimiento

La Ilustración 2 que se muestra a continuación ilustra el flujo de trabajo del procedimiento del ensayo. Después de realizar la PCR, los primers se utilizan para detectar la región de interés y los amplicones se inmovilizan con las microesferas Streptavidin Sepharose® High Performance. A continuación se prepara el ADN monocatenario y luego se hibridan los primers de secuenciación correspondientes con el ADN. Las muestras se analizan en el sistema PyroMark Q24 utilizando archivos de configuración de ensayo y un archivo para la serie analítica.

El valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) se puede ajustar a fin de detectar diferentes mutaciones una vez finalizada la serie analítica (consulte el apartado "Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24", en la página 36, y el apartado "Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* RAS Extension Pyro", en la página 67).

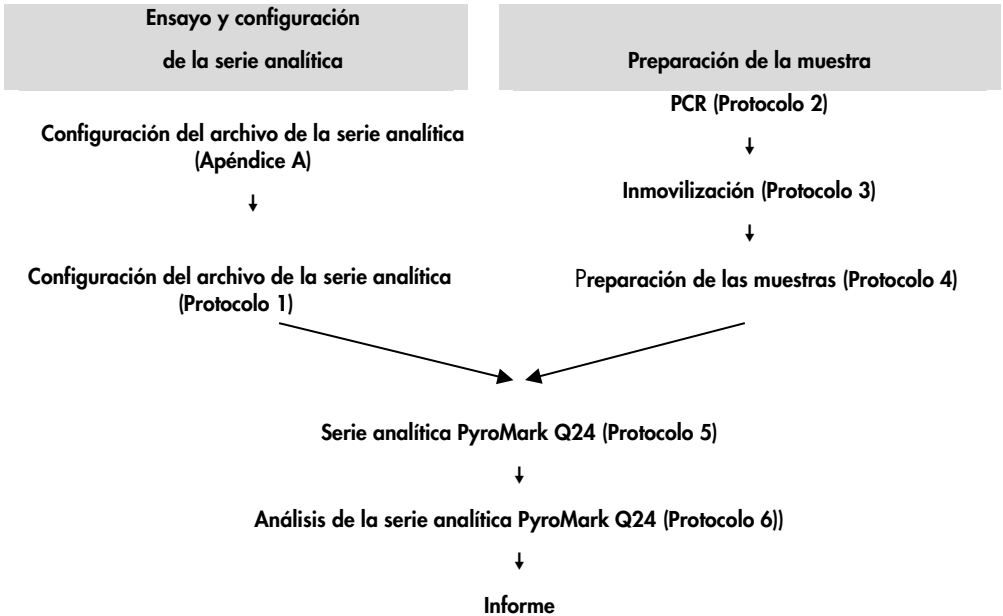


Ilustración 2. Flujo de trabajo del procedimiento del kit theascreen RAS Extension Pyro.

Controles

En el kit se incluye ADN de control no metilado como control positivo para las reacciones de PCR y secuenciación. Este ADN de control presenta un genotipo nativo en las regiones sometidas a secuenciación con este kit. Incluya una muestra con ADN de control para cada uno de los ensayos de todos los análisis de pirosecuenciación. Este proceso es necesario para realizar una correcta interpretación de los resultados e identificación de las mutaciones de bajo nivel (consulte el apartado “Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24”, en la página 36).

Además, debería incluirse un control negativo (sin ADN molde) en cada configuración de PCR de como mínimo un ensayo.

Materiales suministrados

Contenido del kit

Caja 1/2

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
N.º de referencia	971590
Número de extracciones	24
Seq Primer KRAS 59/61 (primer de secuenciación KRAS 59/61)	24 µl
Seq Primer KRAS 117 (primer de secuenciación KRAS 117)	24 µl
Seq Primer KRAS 146 (primer de secuenciación KRAS 146)	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13 (primer de secuenciación NRAS 12/13)	24 µl
Seq Primer NRAS 59 (primer de secuenciación NRAS 59)	24 µl
Seq Primer NRAS 61 (primer de secuenciación NRAS 61)	24 µl
Seq Primer NRAS 117 (primer de secuenciación NRAS 117)	24 µl
Seq Primer NRAS 146 (primer de secuenciación NRAS 146)	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61 (primer de PCR KRAS 59/61)	24 µl
PCR Primer KRAS 117 (primer de PCR KRAS 117)	24 µl
PCR Primer KRAS 146 (primer de PCR KRAS 146)	24 µl

therascreen RAS Extension Pyro Kit	(24)
N.º de referencia	971590
Número de extracciones	24
PCR Primer NRAS 59 (primer de PCR NRAS 59)	24 µl
PCR Primer NRAS 61 (primer de PCR NRAS 61)	24 µl
PCR Primer NRAS 117 (primer de PCR NRAS 117)	24 µl
PCR Primer NRAS 146 (primer de PCR NRAS 146)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix (mezcla maestra para PCR PyroMark), 2x	24 µl
CoralLoad® Concentrate (concentrado CoralLoad®), 10x	4 x 850 µl
H ₂ O	1.2 ml
Unmethylated Control DNA (ADN de control no metilado), 10 ng/µl	6 x 1.9 ml
PCR Primer NRAS 59 (primer de PCR NRAS 59)	3 x 100 µl

Caja 2/2

Tampones y reactivos	Volumen
PyroMark Binding Buffer (tampón de unión PyroMark)	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (tampón de hibridación PyroMark)	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution (solución de desnaturalización PyroMark)*	2 x 250 ml

Tampones y reactivos	Volumen
PyroMark Wash Buffer (tampón de lavado PyroMark), 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (mezcla de enzimas)	2 vials
Substrate Mixture (mezcla de sustratos)	2 vials
dATP α S	2 x 1180 μ l
dCTP	2 x 1180 μ l
dGTP	2 x 1180 μ l
dTTP	2 x 1180 μ l
therascreen RAS Extension Pyro Kit Handbook (English)	1 pc

* Contiene hidróxido de sodio.

Materiales requeridos pero no suministrados

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

Reactivos

- Kit para el aislamiento de ADN (consulte “Aislamiento de ADN”, en la página 19)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n.º de referencia 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Agua ultrapura (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm o equivalente)

Nota: en el kit se incluye agua suficiente para la PCR, para la inmovilización del ADN y para disolver la mezcla de enzimas y la de sustratos; se necesita agua ultrapura adicional para la dilución del tampón de lavado PyroMark, 10x.

- Etanol (70%)*

Consumibles

- Puntas de pipeta estériles (con filtros para la preparación de la PCR)
- Placas de PCR de 24 pocillos (consulte “Placas de 24 pocillos recomendadas”, en la página 14)
- Lámina adhesiva
- PyroMark Q24 Plate (n.º de referencia 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (n.º de referencia 979302)†

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

† Marcado CE-IVD según la Directiva 98/79/CE de la Unión Europea. El resto de los productos indicados no disponen de marcado CE-IVD según la Directiva 98/79/CE de la Unión Europea.

Equipo

- Pipetas (ajustables)*
- Microcentrífuga de mesa*
- Termociclador* y tubos para PCR adecuados
- PyroMark Q24 MDx o PyroMark Q24 (n.º de referencia 9001513 ó 9001514)*
- PyroMark Q24 MDx o PyroMark Q24 Vacuum Workstation (n.º de referencia 9001515, 9001516, 9001518 ó 9001519)*
- Agitador de placas* para la inmovilización de las microesferas (consulte “Mezcladores de placas recomendados”, en la página 14)*
- Bloque térmico* capaz de alcanzar 80 °C

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

Mezcladores de placas recomendados

Los mezcladores de placas orbitales incluidos en la Tabla 1 están recomendados para el uso combinado con el kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Tabla 1. Mezcladores de placas recomendados para el uso combinado con el kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Fabricante	Producto	Referencia
Eppendorf	ThermoMixer® C (dispositivo básico)	5382000031
Eppendorf	SmartBlock™ PCR 96, thermoblock for PCR plates 96	5306000006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

Placas de 24 pocillos recomendadas

Las placas de 24 pocillos incluidas en la Tabla 2 están recomendadas para el uso combinado con el kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Tabla 2. Placas de 24 pocillos recomendadas para el uso con el kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Fabricante	Producto	Referencia
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate, 24-well	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Advertencias y precauciones

Para uso de diagnóstico in vitro.

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre seguridad (SDS). 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

Debe procederse siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- Los componentes de este producto son suficientes para realizar 24 reacciones para cada ensayo.
- Utilice puntas de pipeta estériles con filtros (para la configuración de PCR).
- Almacene y extraiga el material positivo (muestras, controles positivos y amplicones) en procedimientos independientes con respecto al resto de reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en una sala separada físicamente.
- Descongele bien todos los componentes a temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar un ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes (mediante pipeteado repetido ascendente y descendente o invirtiendo cada tubo manualmente) y centrifúguelos brevemente.
- Los resultados erróneos no deben tenerse en cuenta para determinar el estado de la mutación.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

El kit *therascreen* RAS Extension Pyro se envía en 2 cajas. El kit *therascreen* RAS Extension Pyro (caja 1/2) se suministra como envío en hielo seco. La mezcla maestra para PCR PyroMark, el concentrado CoralLoad, el ADN de control no metilado y todos los primers deben conservarse a una temperatura comprendida entre -15 y -25 °C tras su recepción.

Los tampones y reactivos Pyro (caja 2/2) que contienen tampones, mezcla de enzimas, mezcla de sustratos, dATPaS, dCTP, dGTP y dTTP (los reactivos para el análisis de pirosecuenciación) se suministran en paquetes refrigerados. Estos componentes deben conservarse a una temperatura comprendida entre $2-8$ °C tras su recepción. Para reducir al mínimo la pérdida de actividad, se recomienda conservar las mezclas de enzimas y sustratos en los viales suministrados.

Las mezclas de enzimas y sustratos reconstituidas se mantienen estables como mínimo 10 días si se conservan a una temperatura comprendida entre $2-8$ °C. Las mezclas de enzimas y sustratos reconstituidas pueden congelarse y conservarse en sus viales a una temperatura de -15 a -25 °C. Los reactivos congelados no deben someterse a más de 6 ciclos de congelación-descongelación.

Nota: no deben congelarse los nucleótidos. Si se almacena en las condiciones mencionadas, el kit *therascreen* RAS Extension Pyro se mantiene estable hasta la fecha de caducidad.

Obtención y preparación de muestras para el análisis y almacenamiento de las mismas

Nota: todas las muestras deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

El material de las muestras debe ser ADN genómico humano obtenido de tejido FFPE. Las muestras 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 kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

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

- Con los materiales y métodos estándares, fije la muestra de tejido en formalina con tampón neutral (NBF) al 10% y fije la muestra de tejido en parafina. Con un microtomo, corte secciones en serie de 5 μ m del bloque de parafina y colóquelas en un portaobjetos de vidrio.
- Recorra 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 (consulte el punto siguiente).
- En el caso de secciones con < 20% de contenido tumoral por área, macrodisccione 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.

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 -15 y -25 °C durante 8 semanas antes de su uso.

Procedimiento

Aislamiento de ADN

Se recomienda utilizar el kit de QIAGEN que se muestra a continuación en la Tabla 3 para la purificación del ADN del tipo de muestra humana especificado, así como para el uso con el kit *therascreen* RAS Extension Pyro. Para utilizar este kit, siga las instrucciones de purificación del ADN del manual de uso del kit correspondiente.

Tabla 3. Kits de purificación del ADN recomendados para el uso con el kit *therascreen* RAS Extension Pyro


Material de las muestras	Kit de aislamiento de ácidos nucleicos	N.º de referencia
Tejido impregnado en parafina	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404

Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24

Antes de comenzar

- Cree una configuración de la serie analítica tal como se describe en el apartado “Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* RAS Extension Pyro”, en la página 67. La configuración solamente debe realizarse en una ocasión, antes de ejecutar el ensayo RAS Extension Pyro por primera vez.
- No coloque las muestras con una intensidad de señal elevada junto a los pocillos de control sin molde y los pocillos de los que cabe esperar una señal baja. Esto podría provocar señales cruzadas entre pocillos, es decir, la señal de un pocillo se podría detectar en uno de los pocillos circundantes.

Procedimiento

1. Haga clic en  en la barra de herramientas.


Se creará un nuevo archivo de serie analítica.

2. Introduzca los parámetros de la serie (consulte “Parámetros de la serie analítica”, en la página 20).

3. Configure la placa. Para ello, añada los 8 ensayos del kit *therascreen* RAS Extension Pyro en los pocillos correspondientes a las muestras que se van a analizar.

Nota: debería incluirse una muestra de control negativo (sin ADN molde) en cada configuración de PCR de como mínimo un ensayo.

Nota: incluya una muestra con ADN de control no metilado como control nativo para cada ensayo de cada análisis de pirosecuenciación (consulte la imagen “Ilustración 2. Flujo de trabajo del procedimiento del kit *therascreen* RAS Extension Pyro.”, en la página 8.

4. Una vez configurado el ensayo y cuando ya está listo para ser analizado en el sistema PyroMark Q24, imprima una lista de los volúmenes necesarios para la mezcla de enzimas y de sustratos, de los nucleótidos y la configuración de la placa. Seleccione “Pre Run Information” (Información previa de la serie) del menú “Tools” (Herramientas). Cuando aparezca el informe, haga clic en .

5. Cierre el archivo de la serie analítica y cópielo en una unidad USB (suministrada con el sistema) mediante el Explorador de Windows®.

Parámetros de la serie analítica

- **“Run name” (Nombre de la serie analítica):** el nombre de la serie analítica se asigna al guardar el archivo. Si se modifica el nombre del archivo se modifica también el de la serie analítica.
- **“Instrument method” (Método del equipo):** seleccione el método del equipo en función del cartucho que se vaya a utilizar para la serie analítica; consulte las instrucciones suministradas con los productos.
- **“Plate ID” (Identificador de la placa, optional):** introduzca el identificador de la placa PyroMark Q24.

- **“Bar code” (Código de barras, optional):** introduzca un número de código de barras para la placa o, si tiene un lector de códigos de barras conectado al ordenador, sitúe el cursor del ratón en el cuadro de texto “Barcode” (Código de barras) haciendo clic en el cuadro y escanee el código de barras.
- **Kit and reagent ID (Identificador del kit y de los reactivos, optional):** Opcional: introduzca el número de lote del kit *therascreen* RAS Extension Pyro que se va a utilizar. El número de lote se halla en la etiqueta del producto.

Nota: recomendamos introducir ambos números de lote de modo que se pueda realizar el seguimiento de cualquier problema inesperado con el kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

- **Run note (Nota de la serie analítica, optional):** enter a note about the contents or purpose of the run.

Añadir archivos de ensayo

Existen distintos modos de añadir un ensayo a un pocillo:

- Hacer clic con el botón derecho en el pocillo y seleccionar la opción “Load Assay” (Cargar ensayo) del menú contextual
- Seleccionar el ensayo en el navegador de accesos directos y hacer clic y arrastrar el ensayo hasta el pocillo

El color de cada pocillo varía en función del ensayo que se haya cargado.

Introducir identificadores de muestras y notas

Para introducir un identificador de muestra o una nota, seleccione la celda correspondiente y escriba el texto.

Para editar un identificador de muestra o una nota, seleccione la celda (con lo cual se selecciona el contenido actual) o haga doble clic en la misma.

Protocolo 2: Ejecución de la PCR con los reactivos para PCR suministrados con el kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Este protocolo se ha diseñado para la amplificación mediante PCR de 8 regiones distintas en los exones 3 y 4 del gen KRAS humano y en los exones 2, 3 y 4 del gen NRAS humano con el kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- La enzima HotStarTaq® ADN polimerasa de la mezcla maestra para PCR PyroMark requiere un paso de activación de 15 minutos a 95 °C.
- Lleve a cabo todas las mezclas de reacción en una zona distinta de la utilizada para la purificación del ADN. Añada molde a la PCR, al análisis de los productos de PCR o a la preparación de las muestras antes de proceder al análisis de pirosecuenciación.
- Utilice puntas desechables con filtros hidrofóbicos para reducir al mínimo la contaminación cruzada.

Antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos con primers para PCR, centrifúguelos brevemente para depositar el contenido en el fondo de los tubos.
- Ajuste la concentración del ADN de control y de muestra, si es necesario, a 0,4-2 ng/μl.

Procedimiento

1. Descongele todos los componentes necesarios (consulte la Tabla 4, en la Mézclelos bien antes de utilizarlos.
2. Prepare una mezcla de reacción para cada conjunto de primers para la PCR según los datos de la Tabla 4.

Por norma general, la mezcla de reacción contiene todos los componentes necesarios para la PCR excepto la muestra.

Prepare un volumen de mezcla de reacción superior al necesario para el número total de ensayos de PCR que se vayan a realizar.

Tabla 4. Preparación de la mezcla de reacción para cada mezcla de primers para PCR

Componente	Volumen/reacción (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 59/61 or PCR Primer KRAS 117 or PCR Primer KRAS 146 or PCR Primer NRAS 12/13 or PCR Primer NRAS 59 or PCR Primer NRAS 61 or PCR Primer NRAS 117 or PCR Primer NRAS 146	1
Agua (H ₂ O, suministrada)	4
Volumen total	20

3. Agite bien la mezcla de reacción y luego dispense 20 µl en cada tubo de PCR.
No es necesario mantener los tubos de PCR en hielo, puesto que la enzima HotStarTaq ADN polimerasa se mantiene inactiva a temperatura ambiente.
4. Añada 5 µl de ADN molde (2–10 ng de ADN genómico) a cada uno de los tubos de PCR (consulte la Tabla 5) y mezcle bien el contenido.

Nota: debería incluirse una muestra de control negativo (sin ADN molde) en cada configuración de PCR de como mínimo un ensayo.

Nota: incluya una muestra con ADN de control no metilado como control nativo para cada ensayo de cada análisis de pirosecuenciación (consulte la imagen “Controles”, en la página 8).

Tabla 5. Preparación de la PCR

Componente	Volumen/reacción (µl)
Mezcla de reacción	20
ADN de muestra	5
Volumen total	25

5. Programe el termociclador según las instrucciones del fabricante y las condiciones descritas en la Tabla 5.

Table 6. Optimized cycling protocol

	Time	Temperature	Comments
Initial activation step:	15 min	95°C	HotStarTaq DNA polymerase is activated by this heating step
3-step cycling:			
Denaturation	20 s	95°C	
Annealing	30 s	53°C	
Extension	20 s	72°C	
Number of cycles	42	–	
Final extension:	5 min	72°C	

6. Introduzca los tubos de PCR en el termociclador e inicie el programa de ciclado.

7. Una vez terminada la amplificación, proceda con el apartado “Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance”, en la página 26.

Las muestras de PCR se pueden almacenar a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C durante un máximo de 3 días.

Protocolo 3: Inmovilización de los productos de PCR con microesferas Streptavidin Sepharose High Performance

Este protocolo tiene como finalidad la inmovilización del ADN molde en microesferas Streptavidin Sepharose High Performance antes de proceder al análisis en el sistema PyroMark Q24.

Antes de comenzar

- Los reactivos y las soluciones deben estar a temperatura ambiente (15–25 °C) antes de empezar.
- Encienda el sistema PyroMark Q24 al menos 30 minutos antes de iniciar una serie analítica. El botón de encendido se halla en la parte posterior del equipo.
- Coloque un soporte para placas PyroMark Q24 en un bloque térmico precalentado a 80 °C. Deje un segundo soporte para placas PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15–25 °C).
- El tampón de lavado PyroMark se suministra como concentrado 10x. Antes de utilizar el concentrado por primera vez, dilúyalo con solución de trabajo al 1x añadiendo 225 ml de agua ultrapura en 25 ml de tampón de lavado PyroMark 10x (volumen final de 250 ml).

Nota: la solución de trabajo de tampón de lavado PyroMark 1x se mantiene estable a 2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada.

- Prepare la estación de vacío PyroMark Q24 para llevar a cabo la preparación de las muestras tal y como se describe en *PyroMark Q24 User Manual* (Manual de usuario del PyroMark Q24).

Procedimiento

1. Agite con suavidad la botella de Streptavidin Sepharose High Performance hasta que se forme una solución homogénea.
2. Prepare una mezcla maestra para inmovilización de ADN según los datos de la Tabla 7.

Prepare un volumen superior al necesario para el número total de reacciones que se vayan a realizar (para el número de reacciones + una adicional).

Tabla 7. Mezcla maestra para inmovilización de ADN

Componente	Volumen/reacción (µl)
PyroMark Binding Buffer	40
Agua (H ₂ O, suministrada)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Volumen total	70

3. Añada 70 µl de mezcla maestra a los pocillos de la placa de PCR de 24 pocillos, según se haya definido en la configuración de la serie analítica (consulte el apartado "Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", en la página 19).

Las microesferas Sepharose tienen un proceso de sedimentación rápido. Asegúrese de que la mezcla maestra sea homogénea mezclándola frecuentemente con una pipeta o mediante vórtex manual. No centrifugue la mezcla maestra.

4. Añada 10 µl de producto de PCR biotinilado del Protocolo 2 a cada pocillo que contenga mezcla maestra, según se haya definido en la configuración del ensayo (consulte el apartado "Protocolo 2: Ejecución de la PCR con los reactivos para PCR suministrados con el kit", en la página 22).

El volumen total por pocillo debería ser de 80 µl tras la adición de la mezcla maestra y el producto de PCR.

5. Cierre herméticamente la placa de PCR mediante lámina adhesiva.

Asegúrese de que no pueda haber fugas entre pocillos.

6. Agite la placa de PCR hasta que alcance la temperatura ambiente (15–25 °C) durante 5–10 minutos a 1.400 rpm.

Durante este paso, proceda inmediatamente con el apartado “Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24”, en la página 29.

Protocolo 4: Preparación de las muestras previa al análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24

Este protocolo tiene como objetivo la preparación de ADN monocatenario y el annealing del primer de secuenciación con el molde antes de que se realice el análisis de pirosecuenciación en el equipo PyroMark Q24.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos con primers de secuenciación, centrifúgelos brevemente para depositar el contenido en el fondo de los tubos.
- Añada los distintos primers de secuenciación al mismo patrón tal como se ha definido previamente para la placa durante la configuración del ensayo (consulte el apartado “Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24”, en la página 19), según la región que se vaya a analizar.
- Realice regularmente la prueba de funcionamiento de las sondas de filtros tal como se describe en PyroMark Q24 User Manual (Manual de usuario del PyroMark Q24) y sustitúyalas según se indique.

Procedimiento

1. Diluya una cantidad suficiente de cada primer de secuenciación en el tampón de hibridación PyroMark tal como se muestra en la Tabla 8.

Prepare un volumen de primer de secuenciación diluido superior al necesario para el número total de muestras que se vayan a secuenciar (para el número de muestras más una adicional).

No diluya ni almacene más primer de secuenciación del necesario.

Tabla 8. Ejemplo de dilución para primers de secuenciación

Componente	Volumen/muestra (µl)	Volumen para 9+1 reacciones (µl)
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Seq Primer KRAS 59/61 ◐		
Seq Primer KRAS 117 ◐		
Seq Primer KRAS 146 ◐		
Seq Primer NRAS 12/13 ◐	0.8	8
Seq Primer NRAS 59 ◐		
Seq Primer NRAS 61 ◐		
Seq Primer NRAS 117 ◐		
Seq Primer NRAS 146		
Total volumen	25	250

- Añada 25 µl del primer de secuenciación diluido a cada pocillo de la placa PyroMark Q24 de acuerdo con la configuración de la serie analítica (consulte el apartado “Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24”, en la página 19).

Mantenga uno de los soportes para placas PyroMark Q24 (suministrados con la estación de vacío PyroMark Q24) a temperatura ambiente (15–25 °C) y utilícelo como soporte para la preparación de la placa y su desplazamiento.

- Encienda la bomba de vacío de la estación de vacío PyroMark Q24.
- Coloque la placa de PCR del Protocolo 3 y la placa PyroMark Q24 en la estación de vacío (Ilustración 3).

Inspeccione la placa de PCR y asegúrese de que las microesferas Sepharose están en la solución. Asegúrese de cargar la placa de PCR con la misma orientación en la que se han cargado las muestras.



Ilustración 3. Colocación de la placa de PCR y de la placa PyroMark Q24 en la estación de vacío.

5. Active el sistema de vacío de la herramienta.
6. Introduzca con cuidado las sondas de filtro de la herramienta de vacío en la placa de PCR para capturar las microesferas que contienen el molde inmovilizado. Mantenga las sondas en su sitio durante 15 segundos. Extreme la precaución mientras levanta la herramienta de vacío.

Nota: las microesferas Sepharose tienen un proceso de sedimentación rápido. La captura de las microesferas debe realizarse inmediatamente después de la agitación. Si transcurre más de 1 minuto desde la agitación de la placa, vuelva a agitarla durante 1 minuto antes de capturar las microesferas.

Inspeccione la placa de PCR para comprobar si la herramienta de vacío ha succionado todas las muestras completamente.

7. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 40 ml de etanol al 70% (contenedor 1; Ilustración 3). Aclare las sondas de filtros durante 5 segundos.

8. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 40 ml de solución desnaturalizada (contenedor 2; Ilustración 3). Aclare las sondas de filtros durante 5 segundos.
9. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor que contiene 50 ml de tampón de lavado (contenedor 3; Ilustración 3). Aclare las sondas de filtros durante 10 segundos.
10. Suba la herramienta de vacío e inclínela hacia atrás en un ángulo vertical superior a 90° durante 5 segundos para drenar el líquido de las sondas de filtros (Ilustración 4).



Ilustración 4. Ilustración de la herramienta de vacío levantada en un ángulo vertical superior a 90°.

11. Mientras sostiene la herramienta encima de la placa PyroMark Q24, apague el vacío.
12. Libere las microesferas de la placa PyroMark Q24. Para ello, introduzca las sondas de filtro en el primer de secuenciación diluido y mueva la herramienta de vacío suavemente de lado a lado.
Nota: extreme la precaución para no dañar la superficie de la placa PyroMark Q24 arañándola con las sondas de filtro.
13. Transfiera la herramienta de vacío al contenedor de agua ultrapura (contenedor 4; Ilustración 3) y agite la herramienta durante 10 segundos.
14. Introduzca las sondas en el agua ultrapura (contenedor 5; Ilustración 3) y aplique el vacío para lavar las sondas de filtros. Aclare las sondas con 70 ml de agua ultrapura.

-
15. Suba la herramienta de vacío e inclínela hacia atrás en un ángulo vertical superior a 90° durante 5 segundos para drenar el líquido de las sondas de filtros (Ilustración 4).
 16. Desconecte la herramienta de vacío y colóquela en la posición de reposo [Parking (P)].
 17. Desconecte la bomba de vacío.

Nota: al finalizar el día de trabajo, es necesario desechar los residuos líquidos y las soluciones restantes e inspeccionar la estación de vacío PyroMark Q24 para comprobar que no haya polvo ni líquido derramado. Consulte el apartado “Apéndice B: Vaciado del contenedor de residuos y los contenedores”, en la página 73.

18. Caliente la placa PyroMark Q24 con las muestras a 80 °C durante 2 minutos mediante el soporte para placas precalentado PyroMark Q24.
19. Retire la placa PyroMark Q24 del soporte para placas calientes y colóquela en el segundo soporte para placas PyroMark Q24 que había dejado a temperatura ambiente (15–25 °C) para permitir que las muestras se enfríen a temperatura ambiente durante 10–15 minutos.
20. Proceda directamente con el apartado “Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24”, página 34.

Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24

Este protocolo describe el proceso de preparación y carga de los reactivos PyroMark Gold Q24 en el cartucho PyroMark Q24, así como los procesos de inicio y finalización de una serie en el sistema PyroMark Q24. Si desea obtener una descripción detallada sobre la configuración de una serie analítica, consulte *PyroMark Q24 User Manual* (Manual del usuario de PyroMark Q24).

Cuestiones importantes antes de comenzar

- El informe "Pre Run information" (Información previa de la serie), que encontrará en el menú "Tools" (Herramientas) durante la configuración de la serie (consulte el apartado "Protocolo 1: Configuración de la serie analítica para el sistema PyroMark Q24", en la página 19), incluye información sobre el volumen de los nucleótidos, las enzimas y los tampones de sustratos necesarios para cada serie.
- Cargue el cartucho con puntas desechables (sin filtros hidrófobos) para garantizar el correcto funcionamiento del cartucho.

Procedimiento

1. Disuelva las mezclas de enzimas y sustratos congeladas y secadas en 620 µl de agua (H₂O, suministrada).
2. Agite suavemente el vial para mezclar bien el contenido.

Nota: ¡no lo agite mediante vórtice!

Para garantizar que la mezcla se disuelva por completo, déjela reposar a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 5–10 minutos. Antes de llenar el cartucho PyroMark Q24, asegúrese de que la solución no esté turbia. Si no va a utilizar los reactivos inmediatamente, conserve los viales de reactivos en hielo o en una nevera.

3. Espere a que los reactivos y el cartucho PyroMark Q24 alcancen la temperatura ambiente (20–25 °C).
4. Coloque el cartucho PyroMark Q24 con la etiqueta mirando hacia usted.

5. Cargue el cartucho PyroMark Q24 con los volúmenes adecuados de nucleótidos, enzimas y mezclas de sustratos según la Ilustración 5, en la página 35.

Asegúrese de que no se transfieran burbujas de aire de la pipeta al cartucho.

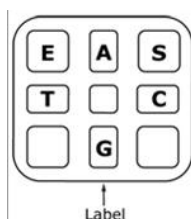


Ilustración 5. Ilustración de la vista superior del cartucho PyroMark Q24. Las anotaciones corresponden a la etiqueta de los viales de reactivos. Añada el volumen de mezcla de enzimas (**E**), mezcla de sustratos (**S**) y nucleótidos (**A**, **T**, **C**, **G**) que se indica en la información sobre volúmenes del informe de información previa de la serie, que encontrará en el menú "Tools" (Herramientas) durante la configuración del ensayo.

6. Abra el compartimento para cartuchos e introduzca el cartucho cargado con reactivos con la etiqueta mirando hacia afuera. Empuje el cartucho hasta el final y luego presione hasta que encaje.
7. Asegúrese de que la línea en la parte frontal del cartucho sea visible y cierre el compartimento.
8. Abra el bastidor para placas y coloque la placa en el bloque térmico.
9. Cierre el bastidor para placas y la cubierta del equipo.
10. Conecte la unidad USB (donde se ha guardado el archivo de la serie analítica) al puerto USB situado en la parte frontal del equipo.

No desconecte la unidad USB hasta que finalice la serie analítica.

11. Seleccione "Run" (Ejecutar serie analítica) en el menú principal (mediante los botones ▲ y ▼ de la pantalla) y luego pulse "OK" (Aceptar).

12. Seleccione el archivo de la serie analítica mediante los botones ▲ y ▼ de la pantalla.
Si desea ver el contenido de una carpeta, selecciónela y luego pulse "Select" (Seleccionar). Para volver a la vista anterior, pulse "Back" (Atrás).
13. Una vez seleccionado el archivo de la serie analítica, pulse "Select" (Seleccionar) para iniciar la serie analítica.
14. Cuando termina la serie analítica y el equipo confirma que el archivo de la serie analítica se ha guardado en la unidad USB, pulse "Close" (Cerrar).
15. Retire la unidad USB.
16. Abra la tapa del equipo.
17. Abra el compartimento para cartuchos y extraiga el cartucho de reactivos (levántelo y sáquelo).
18. Cierre el compartimento.
19. Abra el bastidor para placas y extraiga la placa del bloque térmico.
20. Cierre el bastidor para placas y la cubierta del equipo.
21. Deseche la placa y limpie el cartucho siguiendo las instrucciones de la hoja del producto suministradas con el cartucho.
22. Revise la serie analítica según las indicaciones del apartado "Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24", en la página 36.

Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24

En este protocolo se describe el análisis de mutaciones de un análisis thetascreen RAS Extension Pyro finalizado realizado con el software PyroMark Q24.

Procedimiento

1. Introduzca la unidad USB donde haya guardado el archivo de la serie analítica procesado en el puerto USB del ordenador.

2. Copie el archivo de la serie analítica de la unidad USB a la ubicación deseada del ordenador mediante el Explorador de Windows.
3. Abra el archivo de la serie analítica en el modo AQ del software PyroMark Q24. Para hacerlo, seleccione "Open" (Abrir) en el menú "File" (Archivo) o haga doble clic en el archivo (📁) desde el navegador de accesos directos.
4. Si utiliza RAS Extension Plug-In Report para generar un informe Plug-in, seleccione "AQ Add On Reports/RAS Extension" (Añadir AQ en informes/ RAS Extension) de "Reports" (Informes) en el menú (consulte la Ilustración 6).

Nota: las mutaciones del codón 61 de KRAS deben analizarse además con el complemento de KRAS por separado, seleccionando "AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61" (Añadir AQ en informes/KRAS/codón 61) de "Reports" (Informes) en el menú

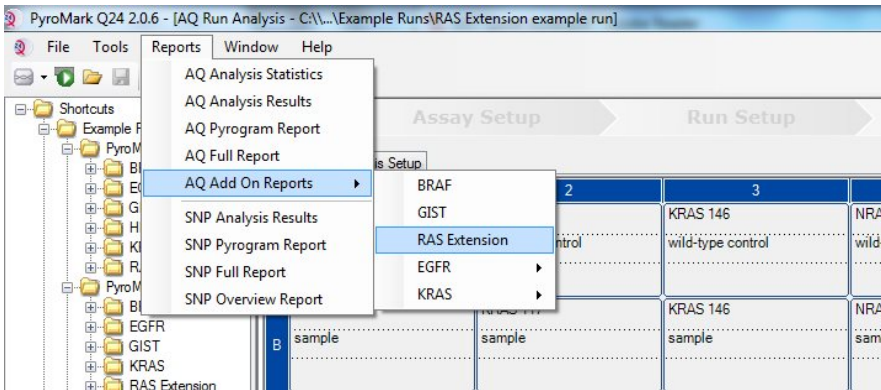


Ilustración 6. Menú de RAS Extension Plug-In Report.

Se analizan automáticamente todos los pocillos para detectar todas las mutaciones cuyos valores LOD se indican en la Tabla 9, página 45. Los resultados se presentan en una tabla de resumen (consulte la Ilustración 7) y, seguidamente, se muestran los resultados detallados, que incluyen, por ejemplo, pirogramas y análisis de calidad.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	KRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A2	KRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A3	KRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
A4	NRAS Codon 12 and 13	wild-type control	No mutation detected				
A5	NRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A6	NRAS Codon 61	wild-type control	No mutation detected				
A7	NRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A8	NRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
B1	KRAS Codon 59	sample	Mutation	35,0	175G>A	A59T	
B2	KRAS Codon 117	sample	No mutation detected				
B3	KRAS Codon 146	sample	Mutation	29,6	437C>T	A146V	
B4	NRAS Codon 12 and 13	sample	No mutation detected				
B5	NRAS Codon 59	sample	Mutation	20,5	176C>G	A59G	
B6	NRAS Codon 61	sample	No mutation detected				
B7	NRAS Codon 117	sample	Potential low level mutation	5,0	351G>C	K117N	⚠
B8	NRAS Codon 146	sample	No mutation detected				
C1	KRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C2	KRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C3	KRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠
C4	NRAS Codon 12 and 13	NTC	Failed Analysis				⚠
C5	NRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C6	NRAS Codon 61	NTC	Failed Analysis				⚠
C7	NRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C8	NRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Ilustración 7. RAS Extension Plug-In Report.

5. Si utiliza el análisis AQ:

Para analizar la serie analítica y obtener un resumen de los resultados, haga clic en uno de los botones de análisis.



Analizar todos los pocillos



Analizar el pocillo seleccionado

Los resultados del análisis (frecuencias de alelos) y la valoración de la calidad se muestran encima de la posición de variable en el trazado de pirograma. Si desea

obtener una descripción detallada sobre cómo realizar una serie analítica, consulte *PyroMark Q24 User Manual* (Manual de usuario del PyroMark Q24).

Para generar un informe, seleccione "AQ Full Report" (Informe completo de AQ) o "AQ Analysis Results" (Resultados del ensayo AQ) en el menú "Reports" (Informes).

Nota: para garantizar la fiabilidad de los resultados, se recomienda utilizar alturas de pico individual superiores a 30 RLU. Defina el valor "required peak height for passed quality" (altura de pico necesaria para calidad garantizada) en 30 RLU durante la configuración del ensayo y compruebe que el factor de reducción del pico A se haya definido en 0,86 para el análisis del codón 61 de NRAS (consulte el apartado "Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* RAS Extension Pyro", en la página 67, y *PyroMark Q24 User Manual* [Manual de usuario del PyroMark Q24]).

Se recomienda utilizar el informe "AQ Analysis Results" (Resultados del ensayo AQ), para documentar e interpretar la cuantificación de los alelos. Los números que se muestran en el pirograma son números redondeados que no indican la cuantificación exacta.

Nota: el pirograma debe compararse siempre con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana de pirograma. Los picos medidos deberían coincidir con la altura de las barras del histograma. Consulte también en la página 42 el apartado "Interpretación de los resultados".

Se recomienda volver a analizar las muestras en las que no se ha detectado mutación con el valor estándar de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) o cuyas valoraciones de calidad han obtenido los valores "Check" (Revisar) o "Failed" (Errónea).

El valor estándar de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar), tal como se ha definido en la configuración del análisis, es el que se utiliza para detectar las mutaciones puntuales más habituales de los ensayos *therascreen* RAS Extension Pyro.

Se recomienda volver a analizar manualmente todas las muestras en las que no se ha detectado mutación con el valor estándar de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se

debe analizar), así como todas las muestras para las que se han obtenido los valores "Check" (Revisar) o "Failed" (Errónea) en la valoración de la calidad. Las valoraciones de calidad con un valor "Check" (Revisar) y "Failed" (Errónea) pueden ser indicio de una mutación que no se analice con el valor estándar de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) y que puede dar lugar a picos de referencia imprevistos.

Para volver a analizar y detectar otras mutaciones, vaya a "Analysis Setup" (Configuración del análisis) y modifique el valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) según las variantes que se describen en la Tabla 16 y la Tabla 17 del Apéndice A o las variantes de otras mutaciones poco frecuentes o imprevistas. Haga clic en "Apply" (Aplicar) y luego en "To All" (A todos) cuando aparezca la ventana "Apply Analysis Setup" (Aplicar configuración del análisis).

Las frecuencias actualizadas de las mutaciones en los genes KRAS y NRAS humanos se pueden descargar en línea desde el sitio Web del Instituto Sanger: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Nota: después de cambiar el valor de la opción "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar), asegúrese de que el umbral para la altura de pico único se haya definido en 30 RLU y compruebe que el factor de reducción del pico A se haya definido en 0,86 para el análisis del codón 61 de NRAS (consulte el apartado "Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* RAS Extension Pyro").

Nota: es posible que existan mutaciones poco frecuentes o no previstas adicionales en la región secuenciada. Dichas mutaciones se pueden analizar mediante los valores alternativos para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) teniendo en cuenta las mutaciones no previstas.

Nota: si los picos medidos no coinciden con la altura de las barras del histograma y dicha diferencia no se debe a mutaciones raras o imprevistas, el resultado no puede

considerarse válido para determinar el estado de la mutación. Se recomienda volver a analizar la muestra.

Interpretación de los resultados

Interpretación de los resultados del análisis y detección de mutaciones de bajo nivel

Incluya una muestra con ADN de control para cada uno de los ensayos de todos los análisis de pirosecuenciación. Este proceso es necesario para realizar una correcta interpretación de los resultados e identificación de las mutaciones de bajo nivel y como control para los niveles de referencia. La frecuencia medida de la muestra de control debería ser inferior o igual que el límite de blanco (LOB). Se pueden utilizar los valores LOB (límite de blanco) y LOD (límite de detección) indicados en los manuales para determinar la presencia de una mutación. Estos valores se han obtenido a partir de mezclas de plásmidos que contenían la secuencia nativa o mutada correspondiente.

El análisis con el software PyroMark Q24 o con los complementos Plug-in Report puede dar 3 posibles resultados. Para conocer los datos del LOD, consulte la Tabla 9.

- Frecuencia de la mutación $< \text{LOD}$: mutación no detectada
- Frecuencia de la mutación $> \text{LOD} + 3$ unidades porcentuales: mutación
- Frecuencia de la mutación $\geq \text{LOD}$ y $\leq \text{LOD} + 3$ unidades porcentuales: posible mutación de bajo nivel

Nota: si utiliza RAS Extension Plug-In Report (consulte el paso 5 de "Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24", en la página 36) y se da este caso, aparecerá un aviso.

El rango comprendido entre LOD y $\text{LOD} + 3$ unidades porcentuales permite detectar con un alto nivel de sensibilidad mutaciones de bajo nivel si se dan las condiciones adecuadas. Una frecuencia medida superior al LOB en la muestra de control no metilada indica un nivel de fondo superior al habitual en la serie analítica correspondiente, lo que puede afectar la cuantificación de los alelos, especialmente en el caso de niveles mutacionales bajos. Por lo

tanto, deben evaluarse detenidamente los resultados con la advertencia "Potential low level mutation" (Posible mutación de bajo nivel).

Las muestras cuyos resultados indican la posible presencia de una mutación de bajo nivel solamente se pueden considerar positivas para la mutación si dicha posibilidad se confirma al analizarlas por duplicado con ADN de control no metilado. El resultado de ambos duplicados debe indicar la misma mutación con valores \geq LOD y la muestra de control debe generar el resultado "No mutation detected" (Mutación no detectada). De lo contrario, la muestra se considera "No mutation detected" (Mutación no detectada).

Para determinar si existe un fondo incrementado para la mutación, deben compararse los valores LOB indicados en el manual con las mediciones obtenidas con el ADN de control no metilado. Las muestras cuyos resultados indican la posible presencia de una mutación de bajo nivel pueden clasificarse como "Mutation not detected" (Mutación no detectada) sin necesidad de repetición, siempre y cuando la frecuencia medida del ADN de control no metilado sea superior al valor LOB indicado en el manual para la mutación correspondiente. Por lo tanto, las posibles mutaciones de bajo nivel ofrecen 3 posibles escenarios distintos.

1. Frecuencia de medición con ADN de control no metilado $>$ LOB para la mutación: la muestra se clasifica como "Mutation not detected" (Mutación no detectada) sin necesidad de repetición.
2. Resultado no reproducido por duplicado con el mismo resultado: la muestra se clasifica como "Mutation not detected" (Mutación no detectada).
3. Obtención del mismo resultado en el análisis por duplicado con muestra nativa $<$ LOB para la mutación correspondiente: mutación detectada.

Nota: el pirograma debe compararse siempre con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana de pirograma. Los picos medidos deberían coincidir con la altura de las barras del histograma. Es necesario revisar los pirogramas para detectar la aparición de picos imprevistos. Si los picos medidos no coinciden con la altura de las barras del histograma y dicha diferencia no se debe a mutaciones poco frecuentes o no previstas, se recomienda volver a analizar la muestra. El resultado erróneo no debe tenerse en cuenta para determinar el estado de la mutación. En

el caso de las mutaciones válidas, un cambio en la altura del pico siempre está relacionado con un cambio en la altura de otro pico. Un cambio en la altura de un solo pico no debería ser considerado indicio de mutación.

Nota: se recomienda utilizar RAS Extension Plug-in Report para la interpretación de los resultados. Para realizar un examen más detenido de las muestras con posibles mutaciones de bajo nivel, se recomienda analizar también la muestra manualmente en el software de la aplicación (p. ej., para comparar la frecuencia mutacional de la muestra de control).

Nota: las decisiones relativas a la aplicación de tratamientos para pacientes con cáncer no deben basarse únicamente en el estado mutacional de los genes KRAS y NRAS.

Tabla 9. Valores de los límites LOB y LOD determinados para mutaciones específicas

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LOB (unidades porcentuales)	LOD (unidades porcentuales)	COSMIC ID* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS codon 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS codon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS codon 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS codon 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS codon 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LOB (unidades porcentuales)	LOD (unidades porcentuales)	COSMIC ID* (V70)
38G>C	G13A	0.8	2.8	575
NRAS codon 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS codon 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS codon 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS codon 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* Del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) del Instituto Sanger www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Nivel de mutación mínimo de una muestra que da lugar a una medición de frecuencia \geq LOD

Resultados representativos

Los resultados representativos del pirograma se muestran de la Ilustración 8 a la Ilustración 15.

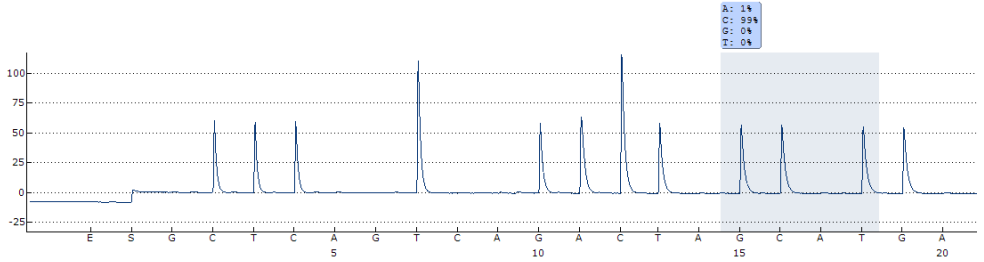


Ilustración 8. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo con el ensayo KRAS 59/61.

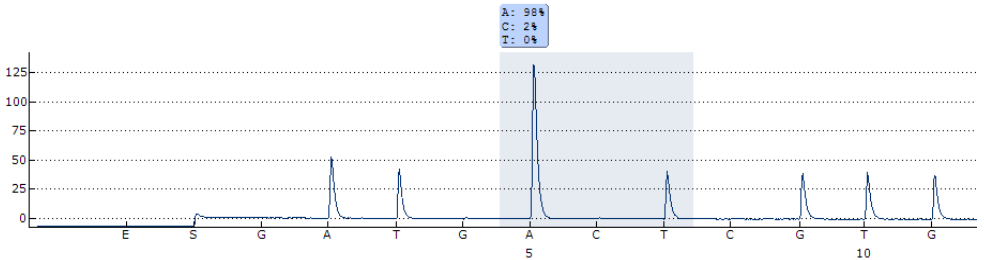


Ilustración 9. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo con el ensayo KRAS 117.

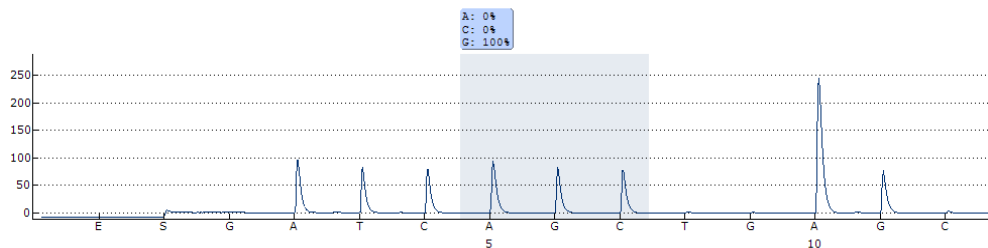


Ilustración 10. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo con el ensayo KRAS 146.

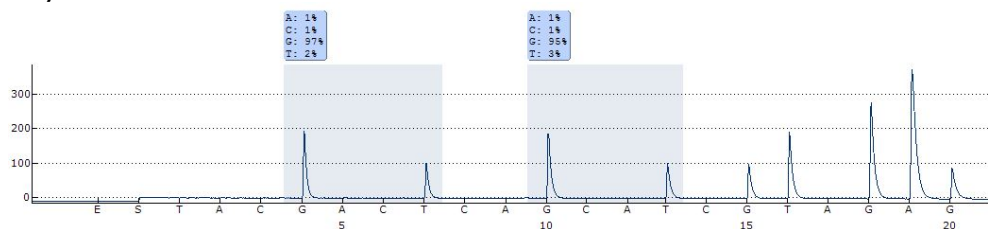


Ilustración 11. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo con el ensayo NRAS 12/13.

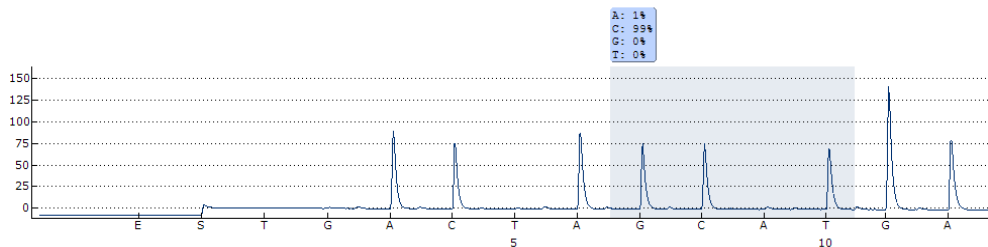


Ilustración 12. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo con el ensayo NRAS 59.

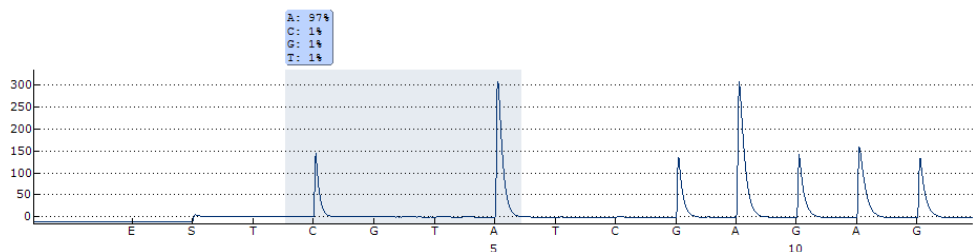


Ilustración 13. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo con el ensayo NRAS 61.

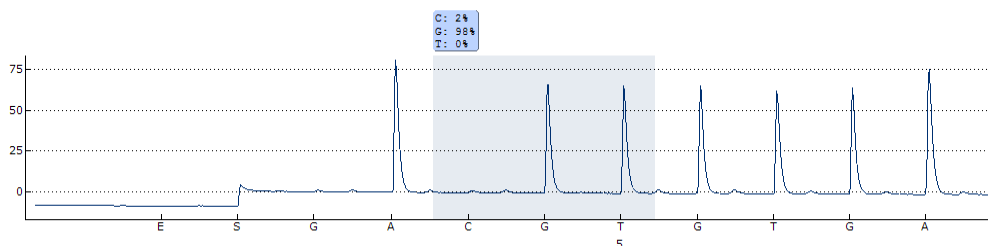


Ilustración 14. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo con el ensayo NRAS 117.

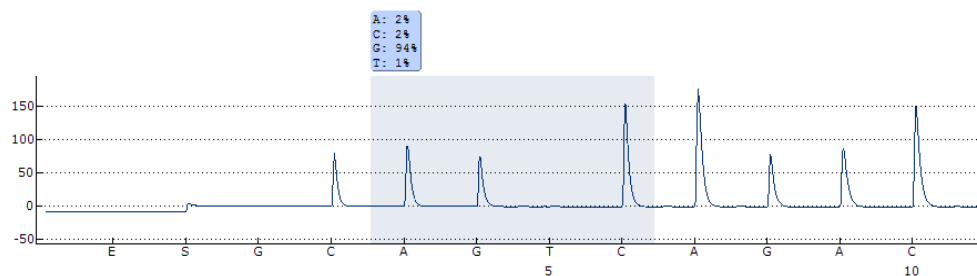


Ilustración 15. Gráfica de pirograma obtenida después de analizar una muestra con un genotipo nativo con el ensayo NRAS 146.

Guía de resolución de problemas

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

Comentarios y sugerencias

Resultado "Check" (Revisar) o "Failed" (Errónea)

- a) Altura de pico baja
- La manipulación de errores durante la configuración de la PCR o la preparación de las muestras previa a la pirosecuenciación puede generar picos bajos.
- Es importante que la herramienta de vacío succione totalmente las muestras. Procure que la herramienta de vacío descienda lentamente hacia las muestras y que la orientación de la placa de PCR o las tiras utilizadas para la inmovilización permita la succión total de las muestras.
- Realice regularmente la prueba de funcionamiento de las sondas de filtros tal como se describe en *PyroMark Q24 User Manual* (Manual de usuario del PyroMark Q24) y sustitúyalas según se indique.
- Si aparece la advertencia "Check" (Revisar), compare con detenimiento el pirograma con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana del pirograma. Si los picos medidos coinciden con la altura de las barras del histograma, el resultado puede considerarse válido. De lo contrario, se recomienda volver a analizar la muestra.
- b) Mutación no definida en "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar)
- Ajuste la secuencia que se debe analizar en la configuración del ensayo (consulte el apartado "Apéndice A: Configuración de los ensayos *therascreen* RAS Extension Pyro", en la página 67 **Fehler! Textmarke nicht definiert.**) y vuelva a analizar la serie. Las mutaciones que no quedan cubiertas con "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) se pueden identificar con la herramienta de simulación de patrones.

Comentarios y sugerencias

- | | | |
|----|---|--|
| c) | Mutación poco frecuente no prevista | Un valor "Check" (Revisar) o "Failed" (Errónea) para la valoración de la calidad puede ser debido a un patrón de picos no esperado. Esta situación puede indicar una mutación no esperada y que, por lo tanto, no se analiza si se utiliza el valor indicado para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar). Estas muestras deberían analizarse utilizando los valores alternativos para "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) teniendo en cuenta las mutaciones no previstas. Las mutaciones que no quedan cubiertas con "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) se pueden identificar con la herramienta de simulación de patrones. |
| d) | Advertencia de desviación elevada en la altura del pico para una dispensación | El pirograma debe compararse siempre con el histograma, que puede visualizarse haciendo clic con el botón derecho en la ventana de pirograma. Si los picos medidos no coinciden con la altura de las barras del histograma y dicha diferencia no se debe a mutaciones poco frecuentes, se recomienda volver a analizar la muestra. |

Ruido de fondo elevado

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Almacenamiento incorrecto de los nucleótidos | Conserve los nucleótidos a 2–8 °C. Su almacenamiento a una temperatura comprendida entre –15 y –25 °C puede provocar un aumento del fondo. |
| b) | Tiempo de enfriamiento demasiado corto antes de realizar el análisis de pirosecuenciación | Mantenga las muestras en un soporte para placas PyroMark Q24 a temperatura ambiente durante 10–15 minutos. No reduzca el tiempo de enfriamiento. |
| c) | Contaminación del cartucho | Limpie con cuidado el cartucho tal como se describe en la hoja del producto. Conserve el cartucho protegido de la luz y el polvo. |

Ausencia de señales en el control positivo (ADN de control no metilado)

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Mezcla de enzimas o de sustratos insuficiente para todos los pocillos | Asegúrese de llenar el cartucho PyroMark Q24 según la información de "Pre Run Information" (Información previa de la serie) que encontrará en el menú "Tools" (Herramientas). |
| b) | Reactivos guardados o diluidos incorrectamente | Prepare los reactivos según las instrucciones descritas en el apartado "Almacenamiento y manipulación de reactivos", en la página 16, y el apartado "Protocolo 5: Funcionamiento del sistema PyroMark Q24", en la página 34. |
| c) | Error de la PCR o de la preparación de las muestras | Limpie con cuidado el cartucho tal como se describe en la hoja del producto. Conserve el cartucho protegido de la luz y el polvo. |

Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *therascreen* RAS Extension Pyro se analiza para comprobar las especificaciones predeterminadas y garantizar una calidad uniforme de los productos.

Limitaciones

El ensayo se ha diseñado para la detección de 37 mutaciones en los genes KRAS y NRAS. Es posible que las muestras con un resultado “No Mutation Detected” (mutación no detectada) incluyan mutaciones de KRAS o NRAS que no se pueden detectar con este ensayo.

La detección de las mutaciones depende de la integridad de la muestra y del volumen de ADN amplificable que contiene la muestra.

El kit *therascreen* RAS Extension Pyro se utiliza en un procedimiento que emplea la reacción en cadena de la polimerasa (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 interpretación de los resultados de diagnóstico obtenidos debe realizarse en combinación con otros resultados clínicos o de laboratorio.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN.

Características de rendimiento

Límite de blanco y límite de detección

Se ha determinado el límite de blanco (LOB) y el límite de detección (LOD) de una serie de mutaciones utilizando mezclas de plásmidos (Tabla 10). Los límites LOB y LOD se han determinado según las recomendaciones de los requerimientos *EP17-A del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI)*, “*Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline*” (Protocolo para la determinación de los límites de detección y cuantificación; directriz aprobada) (codones 12, 13 y 61 de NRAS y codón 61 de KRAS) y *EP17-A2 “Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition”* (Evaluación de la capacidad de detección de los procedimientos de medición en los laboratorios clínicos; directriz aprobada, segunda edición) (para el resto de codones). Los errores α y β (falsos positivos y falsos negativos, respectivamente) se establecieron en un 5%. Los valores del LOB representan la frecuencia medida obtenida con una muestra nativa. Los valores del LOD representan la señal más baja (frecuencia medida) que puede considerarse positiva para la mutación correspondiente.

Tabla 10. Valores de los límites LOB y LOD determinados para mutaciones específicas

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LOB (unidades porcentuales)	LOD (unidades porcentuales)	COSMIC ID* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS codon 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS codon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS codon 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS codon 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS codon 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LOB (unidades porcentuales)	LOD (unidades porcentuales)	COSMIC ID* (V70)
38G>C	G13A	0.8	2.8	575
NRAS codon 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS codon 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS codon 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS codon 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* Del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) del Instituto Sanger www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Nivel de mutación mínimo de una muestra que da lugar a una medición de frecuencia \geq LOD

Mutaciones GGT > TGT y GGT > GTT en el codón 13 de NRAS

Para estas mutaciones, las mediciones de blanco estaban muy próximas a 0 unidades porcentuales, lo que daba lugar a una distribución no gaussiana. Por lo tanto, el LOD se determinó con un método distinto, siguiendo las recomendaciones de los requerimientos EP17-A del CLSI. La señal más baja que indica la presencia de una mutación (LOD) en estas posiciones se ha establecido en 2 unidades porcentuales, un valor por encima del nivel de

referencia respectivo definido por el percentil 95 de las mediciones del blanco. Al analizar una muestra con el nivel de mutación indicado entre paréntesis en la Tabla 9, el 95% de los resultados (n=72) obtuvieron una señal que puede considerarse positiva (\geq LOD). Para conocer los datos del LOB/LOD, consulte la Tabla 9.

Nota: los primers de PCR y pirosecuenciación para los codones 12, 13 y 61 de NRAS se obtienen del kit *therascreen* NRAS Pyro (n.º de referencia 971530) y no se les aplica ningún cambio. Los datos de rendimiento de estos codones de NRAS no se modifican.

Linealidad

La linealidad se ha determinado mediante mezclas de plásmidos que contenían la secuencia nativa o mutada de las mutaciones 176C>G en el codón 59 de KRAS, 351A>T en el codón 117 de KRAS, 436G>C en el codón 146 de KRAS, 34G>A en el codón 12 de NRAS, 37G>A en el codón 13 de NRAS, 175G>A en el codón 59 de NRAS, 182A>G en el codón 61 de NRAS, 351G>C en el codón 117 de NRAS y 437C>T en el codón 146 de NRAS. Los plásmidos se mezclaron proporcionalmente hasta obtener 4 niveles de mutaciones (5, 10, 30 y 50%). Se analizó cada mezcla con 3 lotes distintos del kit *therascreen* RAS Extension Pyro en 3 análisis de pirosecuenciación con 3 réplicas cada uno.

Los resultados (n=9 para cada nivel de mutación) se analizaron según la directriz EP6-A2 del CLSI "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" (Evaluación de la linealidad de los procedimientos de medición cuantitativa: un enfoque estadístico; directriz aprobada) con el software Analyse-it® v2.21. Los resultados se muestran en la Ilustración 16.

Los resultados fueron lineales dentro de una no linealidad permitida de 5 unidades porcentuales en el intervalo analizado con unos niveles de mutación comprendidos entre el 5 y el 50%. Se obtuvieron resultados similares para todas las mutaciones cubiertas de los codones 59, 117 y 146 de KRAS y los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de NRAS.

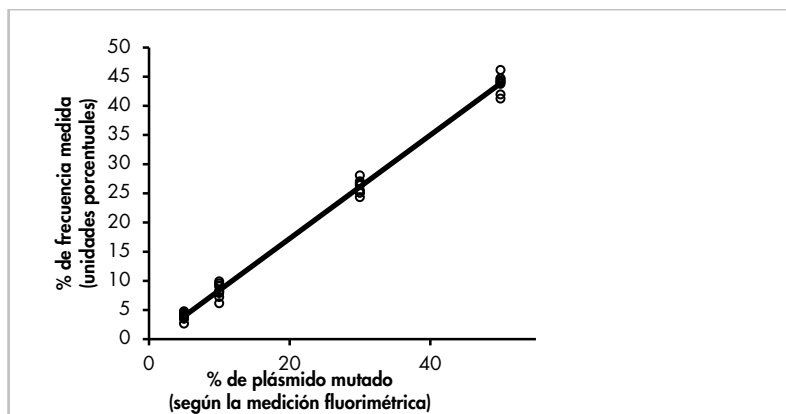


Ilustración 16. Linealidad de la mutación 176C>G en el codón 59 de KRAS.

Se obtuvieron resultados similares para todas las mutaciones cubiertas de los codones 59, 117 y 146 de KRAS y los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de NRAS.

Precisión

Los datos de precisión que permiten determinar la variabilidad total de los ensayos se obtuvieron de 3 niveles distintos del análisis de las mezclas de plásmidos mencionadas anteriormente con 3 réplicas cada una.

La repetibilidad (variabilidad intraensayo e interlote) se calculó a partir de los datos obtenidos para la determinación de la linealidad (3 análisis realizados el mismo día con diferentes lotes del kit *therascreen* RAS Extension Pyro). La precisión intermedia (variabilidad intralaboratorio) se determinó en 3 análisis realizados en un único laboratorio en 3 días distintos. Los análisis los llevaron a cabo usuarios diferentes mediante equipos PyroMark Q24 y numerosos kits *therascreen* RAS Extension Pyro. La reproducibilidad (variabilidad interlaboratorio) se calculó a partir de 2 análisis realizados cada uno en dos laboratorios independientes utilizando lotes diferentes del kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Las estimaciones de precisión se expresan en forma de desviación estándar de las frecuencias de mutación medidas en unidades porcentuales (Tabla 11).

Tabla 11. Precisión de las mutaciones*

% de plásmido mutado [†]	Repetibilidad		Precisión intermedia		Reproducibilidad	
	Media	DA	Media	DA	Media	DA
176C>G en el codón 59 de KRAS						
5	4.0	0.7	3.8	0.6	4.2	1.1
10	8.4	1.2	8.5	1.0	8.4	1.4
30	26.1	1.2	26.3	1.1	26.8	1.2
50	43.9	1.5	44.0	0.7	43.7	1.3
351A>T en el codón 117 de KRAS						
5	5.5	1.6	5.5	2.2	7.1	2.0
10	11.0	1.7	10.8	1.4	12.5	2.9
30	30.6	1.7	30.6	2.0	31.9	2.7
50	52.8	2.0	53.5	1.3	54.5	1.6
436G>C en el codón 146 de KRAS						
5	4.2	0.6	4.1	0.5	3.7	1.2
10	9.6	0.9	9.1	0.9	8.6	1.3
30	29.0	0.9	28.8	1.0	28.1	1.1
50	47.5	1.5	46.8	0.7	45.6	1.9
34G>A en el codón 12 de NRAS[‡]						
5	7.5	1.2	7.3	1.0	6.7	1.3
10	14.6	1.3	13.5	1.1	13.7	1.3
30	37.8	1.9	37.9	1.5	36.1	2.9
50	59.8	1.7	60.4	2.0	57.5	3.1
175G>A en el codón 59 de NRAS						
5	7.8	0.9	7.3	0.5	7.1	1.3
10	11.9	1.0	11.6	2.0	12.5	1.7
30	29.5	1.1	29.6	1.2	29.9	1.9
50	49.0	1.1	48.3	1.3	48.9	1.4
182A>G en el codón 61 de NRAS						
5	6.4	0.9	6.8	0.7	7.2	1.0

% de plásmido mutado [†]	Repetibilidad		Precisión intermedia		Reproducibilidad	
	Media	DA	Media	DA	Media	DA
10	11.7	0.9	11.8	1.1	11.8	1.0
30	34.1	1.3	34.6	1.7	33.8	2.5
50	53.1	1.5	53.3	1.8	53.1	2.0
351G>C en el codón 117 de NRAS						
5	4.9	0.2	5.0	0.3	4.5	0.8
10	9.4	0.4	10.3	1.5	9.4	0.5
30	28.7	0.9	28.8	0.7	28.3	1.3
50	48.5	0.4	48.8	0.6	48.8	0.6
437C>T en el codón 146 de NRAS						
5	4.4	0.7	4.6	0.5	4.1	0.9
10	8.8	0.9	8.7	0.8	9.1	0.8
30	28.4	1.1	27.9	0.6	28.4	0.8
50	47.9	1.1	48.1	1.4	48.0	1.1

* Todos los valores se indican como unidades porcentuales. DS: desviación estándar (n=9 para repetibilidad y precisión intermedia, n=12 para reproducibilidad).

† Según la medición fluorimétrica, para 34G>A en el codón 12 de NRAS según la densidad óptica OD₂₆₀.

Evaluación diagnóstica

La evaluación del kit *therascreen* RAS Extension Pyro se ha realizado mediante una comparación con el método de secuenciación Sanger en 2 estudios diferentes.

Se realizó un primer estudio previo para evaluar el kit *therascreen* NRAS Pyro mediante una comparación con el método de secuenciación Sanger. Se extrajo ADN de 100 muestras de tumores de médula ósea fijadas en formalina e impregnadas en parafina (FFPE) y se analizó para detectar mutaciones en los codones 12/13 y el codón 61.

Dado que los ensayos que cubren los codones 12/13 y 61 de NRAS en el kit *therascreen* NRAS Pyro se incluyen en el kit *therascreen* RAS Extension Pyro sin cambios, los resultados se muestran desde la evaluación del kit *therascreen* NRAS Pyro.

En el segundo estudio, se extrajo ADN de 110 muestras tumorales con CRCm fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE) y se analizó para detectar mutaciones en los codones 59, 61, 117 y 146 del gen KRAS humano y en los codones 59, 117 y 146 del gen NRAS humano. Las mutaciones de baja frecuencia se analizaron con ADN plasmídico al que se añadió ADN FFPE nativo.

En ambos estudios, el ADN se aisló mediante el kit QIAamp DNA FFPE Tissue y posteriormente se analizó con ensayos incluidos en el kit *therascreen* RAS Extension Pyro de PyroMark Q24. La secuenciación Sanger se llevó a cabo en Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer.

Evaluación de los codones 12, 13 y 61 de NRAS

De las 100 muestras analizadas mediante secuenciación Sanger, se determinó el estado mutacional de 97 muestras tanto para el codón 12/13 como para el codón 61. En 4 de las 100 muestras se detectó una mutación en el codón 12 o en el codón 13 mediante secuenciación Sanger.

En 2 de las 100 muestras, se reprodujo el estado mutacional mediante el kit *therascreen* NRAS Pyro y no se detectó ninguna mutación. Los resultados se muestran en la Tabla 12. No se detectaron mutaciones en el codón 61.

Al excluir las muestras que resultaron erróneas con uno o con ambos métodos, la concordancia de resultados entre el kit *therascreen* NRAS Pyro y la secuenciación Sanger fue del 98% y del 100% para los codones 12/13 y el codón 61, respectivamente. Consulte la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de las muestras analizadas de los codones 12, 13 y 61 de NRAS

		Secuenciación Sanger				Total
		Mutación en codón 12/13	Mutación en codón 61	Nativa	Desco-nocida	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	Mutación en codón 12/13	2	–	–	–	2
	Mutación en codón 61	–	–	–	–	–
	Nativa	2	–	90	3	95
	Desconocida	–	–	3	–	3
	Total	4	–	93	3	100

Evaluación de los codones 59, 61, 117 y 146 de KRAS y los codones 59, 117 y 146 de NRAS

Se extrajo ADN de 110 muestras tumorales con CRCm fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE) y se analizó para detectar mutaciones en los codones 59, 61, 117 y 146 del gen KRAS humano y en los codones 59, 117 y 146 del gen NRAS humano. Debido a la poca abundancia prevista de muestras clínicas, todas las mutaciones cubiertas por el kit *therascreen* RAS Extension se analizaron en 56 muestras adicionales con ADN plasmídico al que se añadió ADN FFPE nativo. Tanto el método de pirosecuenciación como el de secuenciación Sanger detectaron todas las mutaciones.

De las 166 muestras analizadas, se detectaron resultados globales coincidentes entre el kit *therascreen* RAS Extension Pyro y la secuenciación Sanger en 137 muestras (83%).

Los casos discordantes se pueden explicar mediante diversos factores.

A causa del elevado ruido de fondo, 20 muestras obtuvieron resultados erróneos en el análisis de secuenciación Sanger del codón 59 de NRAS.

La secuenciación Sanger no detectó mutaciones en el codón 59 de KRAS ni en el codón 61 de KRAS en 1 y 3 muestras, respectivamente. Las 4 mutaciones obtuvieron resultados de baja frecuencia con la pirosecuenciación (7,5–13,1%). Esto se debe a que la secuenciación Sanger posee una sensibilidad menor (15–20%) que la pirosecuenciación (5%) (2). El resto de muestras válidas resultaron nativas mediante ambas técnicas.

Una muestra se ha clasificado como desconocida para la pirosecuenciación debido a la detección de una doble mutación (KRAS 59–61).

Cuatro muestras que contenían ADN plasmídico añadido mostraron una mutación A>G adicional en la posición 350 de la secuencia de codificación de KRAS, no cubierta por el kit *therascreen* RAS Extension Pyro. Las mutaciones se detectaron a través de un análisis manual.

Tabla 13. Resultados de las muestras analizadas de los codones 59, 61, 117 y 146 de KRAS y los codones 59, 117 y 146 de NRAS

		59 de KRAS	61 de KRAS	117 de KRAS	146 de KRAS	KRASa	NRASb	Nativa	Desco- nocida	Total
therascreen RAS Extension Pyro Kit	59 de KRAS	8	–	–	–	–	–	–	1	9
	61 de KRAS	–	6	–	–	–	–	2	1	9
	117 de KRAS	–	–	4	–	–	–	–	–	4
	146 de KRAS	–	–	–	3	4	–	–	–	7
	KRASa	–	–	–	–	16	–	–	–	16
	NRASb	–	–	–	–	–	28	–	–	28
	Nativa	–	–	–	–	–	–	71	16	87
	Descono- cida	1	–	–	–	–	–	3	2	6
Total	9	6	4	3	20	28	76	20	166	

a Muestras de KRAS adicionadas que presentan las mutaciones 117 y 146 de KRAS.

b Muestras de NRAS adicionadas que presentan las mutaciones 59, 117 y 146 de NRAS.

* En una muestra, se detectó la mutación 146 de KRAS, pero la misma muestra obtuvo un resultado no válido para la mutación 117 de NRAS.

En la Tabla 15 se muestra la sensibilidad y la especificidad de los ensayos por codones.

Tabla 14. Sensibilidad y especificidad de los ensayos de los codones 59, 61, 117 y 146 de KRAS y los codones 59, 117 y 146 de NRAS

	Sensibilidad	Especificidad	Mutación cubierta
Mutación 59 de KRAS	100%	99%	175G>A / 176C>G
Mutación 61 de KRAS	100%	97%	181C>G / 182A>T / 183A>C / 183A>T
Mutación 117 de KRAS	100%	100%	351A>C / 351A>T
Mutación 146 de KRAS	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
Mutación 59 de NRAS	100%	100%	175G>A / 176C>G
Mutación 117 de NRAS	100%	100%	351G>C / 351G>T
Mutación 146 de NRAS	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T









Nota: en todas las series analíticas utilizadas para la determinación de las características de rendimiento, el nivel de señal fue superior a 30 RLU, valores obtenidos de forma rutinaria a partir de 10 ng de ADN aislado de tejido fijado en formalina e impregnado en parafina (FFPE). Los datos de la pirosecuenciación se analizaron mediante RAS Extension Plug-in Report para los codones 59, 117 y 146 de KRAS y los codones 59, 117 y 146 de NRAS.








Referencias

1. Douillard, J.Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., et al. (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1023.
2. Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., Rich, R.G., Hafez, M.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., et al. (2010) Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of *KRAS* mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* **12**, 425.

Símbolos

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

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	
	N.º de referencia
	Número de lote
	Número de material
	Componentes

Símbolo	Definición del símbolo
	Contenido
	Número
	Número mundial de artículo comercial
	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 A: Configuración de los ensayos *therascreen* RAS Extension Pyro

Si se ha instalado RAS Extension Plug-in Report, encontrará las configuraciones de ensayo predefinidas para los codones 59/61, 117 y 146 de KRAS y los codones 12/13, 59, 61, 117 y 146 de NRAS en el navegador de accesos directos del software PyroMark Q24. Para ello, siga la ruta "Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension". En ese caso, no es necesario llevar a cabo los siguientes pasos.


Puede descargar RAS Extension Plug-in Report desde la página de catálogo correspondiente de www.qiagen.com, en la pestaña "Product Resources" (Recursos de producto) del apartado "Protocol Files" (Archivos de protocolo).

Se recomienda utilizar RAS Extension Plug-in Report en lugar de efectuar un análisis manual.

Una vez instalado el complemento o cada vez que actualice un software o instale uno nuevo en el ordenador, deberá comprobar el funcionamiento correcto del mismo tal y como se describe en el documento RAS Extension Plug-In Quick Guide (Guía rápida de RAS Extension Plug-In).

Si RAS Extension Plug-in Report no se ha instalado, el archivo de ensayo debe configurarse manualmente antes de ejecutar el ensayo *therascreen* RAS Extension Pyro por primera vez. Configure el ensayo para los codones 59/61, 117 y 146 de KRAS y los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de NRAS mediante el software PyroMark Q24, tal y como se describe a continuación.

Procedimiento

1. Haga clic en  en la barra de herramientas y seleccione "New AQ Assay" (Nuevo ensayo AQ).
2. La Tabla 9 muestra las secuencias que se deben analizar para los ocho ensayos de RAS Extension Pyro. Escriba la secuencia específica del ensayo en el campo de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar).
3. El valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) puede modificarse después de la serie para analizar mutaciones en otras posiciones (consulte el apartado "Protocolo 6: Serie analítica en el PyroMark Q24", en la página 36).

Para comprobar si existen mutaciones en otros nucleótidos, cambie el valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) según la Tabla 10. Es posible cambiar el valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) después del análisis (si no está bloqueado).

Nota: asegúrese de que el umbral para la altura de pico único se haya definido en 30 RLU. Compruebe también que el factor de reducción del pico A se haya definido en 0,86 para el análisis del codón 61 de NRAS.

Introduzca manualmente el valor de "Dispensation Order" (Orden de dosificación) específico del ensayo que aparece en la Tabla 9.

Nota: no utilice el botón "Generate Dispensation Order" (Generar orden de dosificación). Los valores de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) y "Dispensation Order" (Orden de dosificación) se deben introducir manualmente.


4. Haga clic en la pestaña "Analysis Parameters" (Parámetros de análisis) y aumente el valor de "Peak Height Threshold – Required peak height for Passed quality:" (Umbral de altura del pico: altura de pico necesaria para calidad garantizada) hasta 30.
5. Haga clic en  en la barra de herramientas y guarde el ensayo como "KRAS 59/61", "KRAS 117", "KRAS 146", "NRAS 12/13", "NRAS 59", "NRAS 61", "NRAS 117" o "NRAS 146".

Tabla 15. Preparación del ensayo: valores de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar) y “Dispensation Order” (Orden de dosificación) para los ocho ensayos del kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Ensayo <i>therascreen</i> RAS Extension	Secuencia	Ensayo <i>therascreen</i> RAS Extension
59/61 de KRAS	CTCDTGACCTGCTGT	GCTCAGTCAGACTAGCATGA
117 de KRAS	ATAAHTGTGA	GATGACTCGTG
146 de KRAS	ATCAVCAAAGA	GATCAGCTGAGC
12/13 de NRAS	GNTGNTGTTGGGAAAAGC	TACGACTCAGCATCGTAGAG
59 de NRAS	ACAGNTGGAC	TGACTAGCATGA
61 de NRAS	CNAGAAGAGTA	TCGTATCGAGAG
117 de NRAS	ABTGTGATT	GACGTGTGA
146 de NRAS	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

Tabla 16. Mutaciones habituales del gen KRAS humano detectadas por el kit *therascreen* RAS Extension Pyro con el valor de “Sequence to Analyze” (Secuencia que se debe analizar) correspondiente

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de amino-ácidos	Secuencia que se debe analizar	COSMIC ID* (V70)
KRAS codon 59 (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS codon 61 (CAA)			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTTSACCTGCTGT	550
KRAS codon 117 (AAA)			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
KRAS codon 146 (GCA)			

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de amino-ácidos	Secuencia que se debe analizar	COSMIC ID* (V70)
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAGA	19900

* Del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) del Instituto Sanger www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.


Tabla 17. Mutaciones habituales del gen NRAS humano detectadas por el kit *therascreen* RAS Extension Pyro con el valor de "Sequence to Analyze" (Secuencia que se debe analizar) correspondiente

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de amino-ácidos	Secuencia que se debe analizar	COSMIC ID* (V70)
NRAS codon 12 (GGT)			
34G>A	G12S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	563
34G>T	G12C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	562
34G>C	G12R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	561
35G>A	G12D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	564
35G>T	G12V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	566
35G>C	G12A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	565
NRAS codon 13 (GGT)			
37G>A	G13S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	571
37G>T	G13C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	570
37G>C	G13R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	569
38G>A	G13D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	573
38G>T	G13V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	574
38G>C	G13A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	575
NRAS codon 59 (GCT)			
175G>A	A59T	ACA VCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	-
NRAS codon 117 (AAG)			
351G>C	K117N	ABTGTGATT	-
351G>T	K117N	ABTGTGATT	-
NRAS codon 61 (CAA)			
181C>A	Q61K	VAAGAAGAGTA	580
182A>G	Q61R	CNAGAAGAGTA	584
182A>T	Q61L	CNAGAAGAGTA	583
183A>T	Q61H	CANGAAGAGTA	585
183A>C	Q61H	CANGAAGAGTA	586

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de amino-ácidos	Secuencia que se debe analizar	COSMIC ID* (V70)
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
NRAS codon 146 (GCC)			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	-
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	-

* Del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) del Instituto Sanger www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Apéndice B: Vaciado del contenedor de residuos y los contenedores

 <p>ADVERTENCIA</p>	<p>Productos químicos peligrosos</p> <p>La solución de desnaturalización que se utiliza con la estación de vacío contiene hidróxido de sodio, sustancia que irrita los ojos y la piel.</p> <p>Utilice siempre gafas de seguridad, guantes y bata de laboratorio.</p> <p>El organismo responsable (p. ej., el director del laboratorio) debe adoptar las precauciones necesarias para garantizar la seguridad del entorno de trabajo y que los usuarios del equipo no estén expuestos a niveles peligrosos de sustancias tóxicas (químicas o biológicas) tal como se define en las Hojas de datos sobre la seguridad (SDS) correspondientes o en los documentos de la OSHA*, ACGIH†, o la COSHH‡.</p> <p>El vertido de humos y la eliminación de residuos se debe realizar de acuerdo con todas las normativas y leyes de salud y seguridad nacionales, estatales y locales.</p>
---	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Administración de Seguridad y Salud Ocupacional) (Estados Unidos)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Conferencia de Higienistas Industriales Oficiales de Estados Unidos) (Estados Unidos)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Control de Sustancias Peligrosas para la Salud) (Reino Unido)

Asegúrese de cumplir la normativa medioambiental estatal y local aplicable para la eliminación de los residuos de laboratorio.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Este protocolo requiere el uso de agua ultrapura.

Procedimiento

1. Asegúrese de que no se aplique vacío a la herramienta de preparación de vacío. Asegúrese de que el vacío está cerrado (Off) y de que la bomba de vacío está desconectada.
2. Elimine las soluciones restantes en los contenedores.
3. Lave los contenedores con agua ultrapura o, si es necesario, sustitúyalos.
4. Vacíe el contenedor de residuos.
5. el tapón puede extraerse sin desconectar el tubo.

Si es preciso limpiar la estación de vacío (por ejemplo, por la presencia de polvo o líquido derramado), siga las instrucciones de *PyroMark Q24 User Manual* (Manual de usuario del PyroMark Q24).

Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	Para 24 reacciones: primers de secuenciación, primers de PCR, ADN de control no metilado, mezcla maestra para PCR PyroMark, concentrado CoralLoad, tampones y reactivos	971590
PyroMark Q24 MDx	Plataforma para la detección de secuencias mediante pirosecuenciación de 24 muestras en paralelo	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Estación de vacío para la preparación de 24 muestras en paralelo, desde el producto de PCR al molde monocatenario	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Software de análisis	9019063
Accessories		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reacción para secuenciación de 24 pocillos	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para la dosificación de nucleótidos y reactivos	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas con filtro reutilizables para las estaciones de vacío PyroMark Q96 y Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Para la comprobación de la instalación del sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para la confirmación del rendimiento del sistema	979304

Product	Contents	Cat. no.
Related products		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	para 50 preparados de ADN: 50 columnas QIAamp MinElute®, proteinasa K, tampones, tubos de recogida (2 ml)	56404

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

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, CoralLoad®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (Grupo QIAGEN); Analyse-it® (Analyse-it Software Ltd); Applied Biosystems®, Variomag® (Thermo Fisher Scientific); Axygen® (Corning Inc.); FrameStar® (4titude Ltd); Milli-Q® (Merck Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); SmartBlock™, ThermoMixer® (Eppendorf AG); Windows® (Microsoft Corporation).

Acuerdo de licencia limitada para el kit *therascreen* RAS Extension Pyro

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

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

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

Mayo-16 HB-1882-002 © 2016 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com