

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



24

Versión 1

IVD

Para uso en diagnóstico in vitro

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

Para uso con el QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

CE

REF

874011



QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R7

MAT

1134665EN

Índice

Uso previsto	4
Usuario previsto	5
Resumen y explicación	6
Principio del procedimiento	7
Materiales suministrados	12
Contenido del kit	12
Materiales necesarios pero no suministrados	14
Advertencias y precauciones	16
Información de seguridad	16
Precauciones generales	16
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	19
Obtención y preparación de materiales de muestras para el análisis y almacenamiento de los mismos	20
Preparación de muestras de tejido para la extracción de ADN de tejido de CCR	20
Preparación de muestras de tejido para la extracción de ADN de tejido de CPNM	21
Almacenamiento de las muestras	22
Protocolo: extracción de ADN	23
Extracción de ADN para muestras de CCR	23
Extracción de ADN para muestras de CPNM	24
Protocolo: evaluación de muestras de ADN	26
Protocolo: detección de mutaciones del KRAS	40
Interpretación de los resultados (manual)	56
Configuración del análisis del software	56
Análisis de los datos de valoración de las muestras	57
Análisis de detección de mutaciones de KRAS	59

Análisis de muestras	61
Interpretación de los resultados	68
Análisis e identificaciones de mutaciones	68
Indicadores del Rotor-Gene Q therascreen KRAS Assay Package	70
Indicadores específicos para CPNM y CCR	71
Marcadores específicos para NSCLC	72
Indicadores específicos para CCR	75
Limitaciones	80
Características de rendimiento	82
Rendimiento analítico	82
Guía de resolución de problemas	138
Control de calidad	140
Referencias	141
Referencias bibliográficas	141
Referencias de utilidad	141
Símbolos	145
Información de contacto	147
Apéndice 1: protocolo manual del therascreen KRAS RGQ PCR Kit	148
Protocolo: creación de un perfil de temperatura	148
Protocolo: Evaluación de las muestras (manual)	161
Protocolo: detección de mutaciones de KRAS (manual)	162
Protocolo: configuración de therascreen KRAS PCR RGQ	162
Información para pedidos	168
Historial de revisiones del documento	170

Uso previsto

El *therascreen*® KRAS RGQ PCR Kit es un ensayo de PCR cualitativa en tiempo real para la detección de 7 mutaciones somáticas en los codones 12 y 13 del oncogén *KRAS* humano mediante el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. El kit está indicado para su uso con ADN extraído de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE) de cáncer colorrectal (CCR) o de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) obtenidas mediante resección (RES), punción con aguja gruesa (CNB) o aspiración con aguja fina (FNA).

Las mutaciones somáticas en el gen *KRAS* son bioindicadores predictivos potenciales de resistencia a las terapias dirigidas al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), como panitumumab y cetuximab, para el tratamiento del CCR. El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit también está indicado para ayudar en la identificación de pacientes con CPNM para el tratamiento con sotorasib (LUMYKRAS®) basándose en un resultado de detección de la mutación de *KRAS* G12C.

Las mutaciones somáticas en el gen *KRAS* también pueden estar indicadas como un bioindicador predictivo potencial para tomar decisiones de tratamiento para otras terapias de CPNM.

El médico valorará el estado de la mutación en el paciente, además de otros factores relativos a la enfermedad, para tomar una decisión sobre el tratamiento. Ninguna decisión de tratamiento para pacientes con cáncer debe basarse únicamente en el estado de mutación de *KRAS*.

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit no está indicado para diagnosticar CCR, CPNM ni ninguna otra enfermedad.

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

Usuario previsto

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit debe ser utilizado por personal capacitado en un entorno de laboratorio profesional.

Resumen y explicación

Las mutaciones en el oncogén *KRAS* se encuentran con frecuencia en los cánceres humanos (1-4). Mediante el uso de las tecnologías ARMS® (Allele Refractory Mutation System) y Scorpions® (5, 6), el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit permite la detección de 7 mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogén *KRAS* sobre un fondo de ADN genómico nativo (Tabla 1). Según los datos de la base de datos COSMIC (2015 v72), las 7 mutaciones detectadas por el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit representan >95 % de todas las mutaciones de *KRAS* notificadas en pacientes con CCR y >88 % de todas las mutaciones notificadas en pacientes con CPNM (7).

Tabla 1. Lista de mutaciones e identidades COSMIC*

Mutación	Cambio de base	ID de 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

* Los ID de COSMIC se han tomado del Catalog of Somatic Mutations in Cancer (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)

La prueba es muy específica y sensible, lo que permite detectar un bajo porcentaje de ADN mutante sobre un fondo de ADN nativo. Si hay suficientes copias de ADN, es posible detectar un 0,8 % de mutante sobre un fondo de ADN genómico nativo.

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se utiliza en un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (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 utiliza 2 tecnologías (ARMS y Scorpions) para la detección de mutaciones mediante PCR en tiempo real.

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit proporciona ocho reacciones de amplificación por PCR independientes: siete reacciones específicas para mutaciones en los codones 12 y 13 del exón 2 del oncogén *KRAS* y un control nativo en el exón 4. A continuación se explican los principales componentes del kit.

Mezclas para reacción de mutación

Cada mezcla de reacción utiliza un cebador ARMS específico para la mutación para amplificar selectivamente el ADN mutado y, a continuación, un cebador Scorpions para detectar el producto de amplificación.

ARMS

La amplificación específica de alelos se logra mediante ARMS, que aprovecha la capacidad de la ADN polimerasa *Taq* para distinguir entre una base coincidente y una no coincidente en el extremo 3' de un cebador de PCR. Cuando la coincidencia con el cebador es completa, la amplificación se produce con total eficacia. Cuando no hay coincidencia con la base 3', únicamente puede producirse una amplificación de fondo de bajo nivel. Por lo tanto, las secuencias mutadas se amplifican de forma selectiva, incluso en muestras cuya mayoría de ADN no presenta la mutación.

Scorpions

La detección de la amplificación se realiza mediante la tecnología Scorpions. Scorpions es una técnica de moléculas bifuncionales que contienen un cebador de PCR unido covalentemente a una sonda. La sonda incorpora el fluoróforo carboxifluoresceína (FAM™) y un 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, lo que da lugar a 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, 13ASP)

Las mezclas de reacción son dobles y contienen reactivos marcados con FAM para detectar dianas y un reactivo marcado con HEX™ para detectar controles internos. Las mezclas de reacción y los reactivos de control positivos contienen tampón Tris EDTA, mientras que el control positivo contiene el transportador Poly A RNA.

Ensayos

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit consta de un procedimiento de dos pasos. En el primer paso, se realiza el ensayo de control para evaluar el ADN total amplificable de KRAS en 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

El CTRL utiliza un cebador Scorpions y un cebador sin marcar para amplificar una secuencia corta del exón 4 del gen *KRAS*. La reacción para 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, se utiliza para evaluar el ADN total amplificable de *KRAS* en una muestra. El ensayo de control amplifica una región del exón 4 del gen *KRAS*. Los cebadores y la sonda Scorpion están diseñados para amplificarse independientemente de cualquier polimorfismo conocido de *KRAS*.

Ensayos de mutación

Cada ensayo de mutación contiene una sonda Scorpion marcada con FAM y un cebador ARMS para distinguir entre el ADN nativo y un ADN mutante específico.

Controles

Nota: Todas las series experimentales deben contener 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, debe tenerse en cuenta que esto también diluye el ADN diana. Con el kit se proporciona 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 de KRAS para utilizarlo como molde en la reacción de control positivo. Se evaluarán los resultados de control positivo para garantizar que el kit funciona según los criterios de aceptación indicados.

Control negativo

Cada serie debe contener un control negativo ("control sin molde") en los tubos del 9 al 13. El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contiene agua para NTC (NTC) para utilizarse como molde para el control sin molde. El control sin molde se utiliza para evaluar las posibles contaminaciones durante la configuración de la serie y para evaluar el rendimiento de la reacción de control interno.

Valoración de las muestras

La mezcla de reacción para control (CTRL) suministrada con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se utiliza para evaluar el ADN de *KRAS* total amplificable en 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 NTC como control sin molde.

Plataforma y software

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se ha diseñado específicamente para su uso con el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. El software Rotor-Gene Q y el *therascreen* KRAS Assay Package están disponibles para su descarga web en www.qiagen.com o por separado en CD.

- Consulte "Materiales necesarios pero no suministrados" en la página 14 para conocer las versiones compatibles del software RGQ y de Rotor-Gene AssayManager.
- Consulte el manual del usuario del instrumento para obtener información sobre el equipo.
- Para minimizar los avisos de los controles y las muestras, se debe cumplir estrictamente la guía de *therascreen KRAS RGQ PCR Kit Instrucciones de uso* con respecto a la ubicación del instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM de acuerdo con los procedimientos de instalación y los requisitos del emplazamiento.
- Consulte Appendix 2 B: Installation of the Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, para obtener instrucciones sobre la instalación del Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package.

El mantenimiento del instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM debe llevarse a cabo de acuerdo con los requisitos del manual de usuario del instrumento. Consulte el manual del usuario para obtener información sobre el instrumento.

Materiales suministrados

Contenido del kit

<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit				(24)
N.º de catálogo				874011
Número de preparaciones				24
Color	Denominación	Identificación de tubos		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
Orange	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
Yellow	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

<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit				(24)
N.º de catálogo				874011
Número de preparaciones				24
Color	Denominación	Identificación de tubos		Volumen
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 NTC)		NTC	1,9 ml
Blanco	Water for Sample Dilution (Agua para dilución de la muestra)		Dil.	1,9 ml
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit Instructions for Use (inglés)				1

Materiales necesarios pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Están disponibles en línea en un formato PDF práctico y compacto en www.qiagen.com/safety, donde puede encontrar, ver e imprimir las SDS de cada kit de QIAGEN y de cada componente del kit.

Asegúrese de que los equipos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, para uso con un rotor de 72 pocillos (QIAGEN, n.º de cat. 981103 o 981106)
- Bisturí nuevo, hoja de afeitar o un instrumento similar con hoja afilada
- Tubos de microcentrifugadora libres de nucleasa para la preparación de mezclas maestras
- Puntas de pipeta estériles con barrera contra aerosoles
- Marcador permanente
- Instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM con canales de fluorescencia para Cycling Green y Cycling Yellow (detección de FAM y HEX, respectivamente)
- Software Rotor-Gene Q versión 2.3.5 o posterior con el KRAS Assay Package versión 3.0.3 instalado para la detección automática de mutaciones.

Nota: El software Rotor-Gene Q se puede utilizar sin el KRAS Assay Package para la detección manual de mutaciones. Consulte "Apéndice 1: protocolo manual del theascreen KRAS RGQ PCR Kit" en la página 148.

- Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes, bloque de aluminio para la preparación manual de las reacciones (QIAGEN, n.º de cat. 9018901)
- Pipetas específicas (regulables) para la preparación de muestras
- Pipetas específicas (regulables) para la preparación de la mezcla maestra de PCR
- Pipetas específicas (regulables) para la dispensación del ADN molde
- Termomezclador, incubador orbital térmico, bloque calefactor o baño de agua con capacidad de incubación a 56 °C, 70 °C y 90 °C
- Centrifugadora de mesa con rotor para tubos de 1,5 ml
- Agitador vórtex de mesa
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, cat. de cat. 60404; consulte "Extracción de ADN para muestras de CCR" en la página 23 y "Extracción de ADN para muestras de CPNM" en la página 24.
 - Xileno
 - Etanol (96-100 %)*

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

Advertencias y precauciones

Para uso en diagnóstico in vitro

Para uso con el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Para uso con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Están disponibles en línea en un formato PDF práctico y compacto en www.qiagen.com/safety, donde puede encontrar, ver e imprimir las SDS de cada kit de QIAGEN y de cada componente del kit.

Precauciones generales

El usuario debe prestar siempre atención a lo siguiente al utilizar el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit:

- La prueba se ha diseñado para su uso con muestras de tejido fijado en formalina e incluido en parafina.
- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. Los materiales de muestra son material potencialmente infeccioso y deben tratarse como material biopeligroso.

- Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.
- Los reactivos para el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit están diluidos de forma óptima. No debe realizarse una mayor dilución de los reactivos, puesto que pueden perder eficacia. No utilice volúmenes de reacción (mezcla de reacción más muestra) inferiores a 25 µl.
- Todos los reactivos del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se han formulado específicamente para su uso con las pruebas que se proporcionan en el kit.
- Todos los reactivos suministrados en el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit deben utilizarse únicamente con los demás reactivos suministrados en el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. No sustituya los reactivos de los *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits, ya que esto puede afectar al rendimiento.
- Utilice únicamente la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) suministrada en el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. No la sustituya por ADN polimerasa *Taq* de otros kits del mismo o de cualquier otro tipo, ni por ADN polimerasa *Taq* de otro proveedor.
- No utilice componentes caducados o mal almacenados.
- Para minimizar los indicadores de los controles y las muestras, se debe seguir estrictamente la guía de las *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit *Instrucciones de uso*, que incluye, entre otros, los siguientes puntos:
 - Es necesaria la mezcla correcta de reactivos y debe asegurarse en cada paso de mezcla durante la configuración del ensayo.
 - Coloque el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM según los procedimientos de instalación y los requisitos de emplazamiento.

Nota: Extreme precauciones para evitar contaminar los reactivos de control y la mezcla de reacción con los materiales sintéticos contenidos en el reactivo de control positivo.

Nota: Utilice pipetas individuales exclusivas para preparar las mezclas de reacción y añadir los reactivos de control positivo.

Nota: Realice la preparación y dispensación de las mezclas de reacción en un área independiente de la que se utilice para la adición del control positivo.

Nota: No abra el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM hasta que haya finalizado la serie.

Nota: No abra los tubos Rotor-Gene Q después de que haya finalizado la serie.

Nota: Se deben extremar las precauciones para garantizar que se hagan de manera correcta las pruebas de las muestras, prestando atención especial a la introducción incorrecta de muestras, los errores de carga y los errores de pipeteo.

Las siguientes frases de riesgo y precaución se aplican a los componentes del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

**ADN polimerasa
Taq**

Contiene: nonilfenol etoxilado. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos a largo plazo. Evitar su liberación al medio ambiente. Llevar guantes de protección, ropa de protección, equipo de protección para los ojos y equipo de protección para la cara. Eliminar el contenido o el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado.

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se envía en hielo seco y debe estar congelado a su llegada. Si algún componente del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit no está congelado a su llegada, si el embalaje exterior se ha abierto durante el transporte, si el envío no contiene un albarán o los reactivos, o si se requiere un manual físico, 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).

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit debe almacenarse inmediatamente tras su recepción a una temperatura de entre -30 y -15 °C en un congelador de temperatura constante y protegido de la luz. Al igual que todas las moléculas marcadas con fluorescencia, los Scorpions deben protegerse de la luz para evitar la fotodecoloración y la pérdida de rendimiento.

Cuando se almacena en las condiciones de almacenamiento recomendadas en su embalaje original, el *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 patológica estándar para garantizar la calidad de las muestras.

Las muestras tumorales son heterogénea. Es posible que los datos de una muestra de tumor no concuerden con otras secciones del mismo tumor. Las muestras tumorales también pueden contener tejido no tumoral. No cabría esperar que el ADN del tejido no tumoral contuviera las mutaciones detectadas por el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Preparación de muestras de tejido para la extracción de ADN de tejido de CCR

- Con los materiales y métodos estándares, fije el material de muestra de tejido en formol con tampón neutro (Neutral Buffered Formalin, NBF) al 10 % e incluya el material de muestra de tejido en parafina. Con un micrótopo, corte secciones en serie de 5 µm del bloque de parafina y colóquelas en portaobjetos de vidrio.
- Una persona cualificada (p. ej., un patólogo) debe evaluar una sección teñida con hematoxilina y eosina (H&E) para determinar el contenido tumoral y el área. Marque el portaobjetos teñido para distinguir el tumor del tejido normal. Utilice secciones en serie para realizar la extracción de ADN.

- Utilice secciones con un contenido de tumor $>20\%$ por área para procesar sin macrodissección.
- En el caso de secciones con un contenido de tumor $\leq 20\%$ por área, macrodisseccione una o más secciones. Deseche el tejido no tumoral.
- Para las secciones con un área $<4\text{ mm}^2$, procese 2 o más secciones para aumentar el área tumoral total a un mínimo de 4 mm^2 (se aplica a muestras con y sin macrodissección). Si se ha realizado una macrodissección, deseche el tejido no tumoral.
- Elimine el exceso de parafina del tejido con un bisturí nuevo, una hoja de afeitar o un instrumento similar con hoja afilada.

Nota: Si se ha realizado una macrodissección, utilice un bisturí seco, una hoja de afeitar o un instrumento similar con hoja afilada. No lleve a cabo este paso en una corriente laminar ni en una campana de gases.

- Raspe el tejido tumoral de las secciones y colóquelo en tubos de microcentrifugadora etiquetados con un bisturí nuevo, una hoja de afeitar o un instrumento similar con hoja afilada para cada muestra.
- Etiquete, manipule y almacene de forma controlada las muestras tumorales, los bloques, los portaobjetos, las muestras y los tubos de microcentrifugadora listos para la extracción.

Preparación de muestras de tejido para la extracción de ADN de tejido de CPNM

- Con los materiales y métodos estándares, fije el material de muestra de tejido en formalina tamponada neutra (Neutral Buffered Formalin, NBF) al 10% e incluya el material de muestra de tejido en parafina. Con un microtomo, corte secciones en serie de $5\text{ }\mu\text{m}$ del bloque de parafina y colóquelas en portaobjetos de vidrio.
- Recurra a una persona cualificada (p. ej., un patólogo) para evaluar una sección teñida con hematoxilina y eosina (H&E) con el fin de determinar el contenido y el área del tumor.

Marque el portaobjetos teñido para distinguir el tumor del tejido normal. Utilice secciones en serie para realizar la extracción de ADN.

- Elimine el exceso de parafina del tejido con un bisturí nuevo, una hoja de afeitar o un instrumento similar con hoja afilada.

Nota: Utilice bisturíes secos, una hoja de afeitar o un instrumento similar con hoja afilada. No lleve a cabo este paso en una corriente laminar ni en una campana de gases.

- Raspe el tejido tumoral de las secciones y colóquelo en tubos de microcentrifugadora etiquetados con un bisturí nuevo, una hoja de afeitar o un instrumento similar con hoja afilada para cada muestra.
- Etiquete, manipule y almacene de forma controlada las muestras tumorales, los bloques, los portaobjetos, las muestras y los tubos de microcentrifugadora listos para la extracción.

Almacenamiento de las muestras

Guarde los bloques y portaobjetos de CRC FFPE a temperatura ambiente. Los portaobjetos pueden almacenarse en la oscuridad a temperatura ambiente durante un máximo de 4 semanas antes de la extracción del ADN.

Guarde los bloques FFPE y los portaobjetos de CPNM en la oscuridad a temperatura ambiente. Los portaobjetos de resección y de punción con aguja gruesa de CPNM pueden conservarse a temperatura ambiente durante un máximo de 70 semanas antes de la extracción del ADN. Los portaobjetos de aspiración con aguja fina de CPNM pueden conservarse a temperatura ambiente durante un máximo de 56 semanas antes de la extracción del ADN.

El ADN genómico puede conservarse a entre 2 y 8 °C durante 1 semana después de la extracción y, a continuación, a una temperatura de entre -25 y -15 °C durante un máximo de 8 semanas antes de su uso.

Protocolo: extracción de ADN

Extracción de ADN para muestras de CCR

Utilice el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, n.º de cat. 60404) con las modificaciones del protocolo descritas a continuación para purificar el ADN genómico de muestras preparadas a partir de muestras de CCR fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE).

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

Haga la extracción de ADN de acuerdo con las instrucciones del *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook* teniendo en cuenta lo siguiente:

- Consulte el *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook* para la preparación de las muestras antes de la extracción de ADN.
- El QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit solo debe utilizarse de forma manual.
- Utilice solo el método de xileno/etanol para la desparafinación, tal como se describe en el *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook* (Manual de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit).
- Asegúrese de utilizar etanol de grado de biología molecular en todos los pasos necesarios.*
- Utilice una sección de 5 µm por extracción (a menos que la sección tenga un contenido tumoral $\leq 20\%$ o un área $< 4 \text{ mm}^2$; consulte "Preparación de muestras de tejido para la extracción de ADN de tejido de CCR" en la página 20 para más información).

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

- La digestión con proteinasa K (tal como se describe en el *Manual de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*) debe realizarse durante 1 hora.
- Las muestras deben eluirse con 200 µl de tampón de elución (Buffer ATE) del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Nota: Almacene el ADN genómico a 2-8 °C durante una semana después de la extracción y, a continuación, a una temperatura de –25 a –15 °C durante un máximo de 8 semanas antes de su uso.

Extracción de ADN para muestras de CPNM

Utilice el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, n.º de cat. 60404) con las modificaciones del protocolo descritas a continuación para purificar el ADN genómico de muestras preparadas a partir de muestras de CPNM FFPE.

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

Realice la extracción de ADN de acuerdo con las instrucciones del *Manual de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* teniendo en cuenta lo siguiente:

- Utilice únicamente el método de xileno/etanol para la desparafinización, tal como se describe en el *Manual de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue*.
- Asegúrese de utilizar etanol de grado de biología molecular en todos los pasos necesarios.*
- Utilice secciones de 2 x 5 µm por extracción.
- El QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit solo debe utilizarse de forma manual.
- La digestión con proteinasa K (tal como se describe en el *Manual de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*) debe realizarse durante 1 hora.

- Añada 60 µl de tampón de elución (ATE) del QIAamp DSP 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 DSP DNA FFPE Tissue Kit e incube durante 2,5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugue a velocidad máxima durante 1 minuto.

Nota: Almacene el ADN genómico a 2-8 °C durante una semana después de la extracción y, a continuación, a una temperatura de -25 a -15 °C durante un máximo de 8 semanas antes de su uso.

Protocolo: evaluación de muestras de ADN

Este protocolo se utiliza para evaluar el ADN amplificable total de las muestras mediante la *therascreen* KRAS QC Locked Template (paquete de ensayo) para la evaluación automatizada de muestras.

Nota: Para la evaluación manual de muestras, consulte "Apéndice 1: protocolo manual del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit" en la página 148.

Cuestiones importantes antes de comenzar

Nota: La evaluación de muestras de ADN no está diseñada para detectar la presencia de inhibidores de la PCR, ya que solo se evalúa el ADN amplificable total de una muestra mediante la reacción de control.

Nota: Es importante utilizar la mezcla de reacción para control tal como se describe a continuación para esta evaluación y no la espectrofotometría u otros métodos alternativos. Es posible que no pueda amplificarse el ADN muy degradado, incluso si los cebadores generan fragmentos cortos de ADN.

- Se pueden evaluar hasta 24 muestras con la mezcla de reacción de control (tubo CTRL) disponible.
- Utilice el CTRL para evaluar el ADN antes de realizar el análisis con el ensayo de evaluación de mutaciones.
- Para garantizar un uso eficiente de los reactivos en el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, agrupe las muestras de ADN en lotes en la medida de lo posible para completar las series. Analizar las muestras de forma individual o en grupos más reducidos consume más reactivos y reduce el número total de muestras que se pueden analizar con un único *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

- No agite en vórtex la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) ni ninguna mezcla que contenga ADN polimerasa *Taq*, ya que esto podría inactivar la enzima.
- Pipetee la ADN polimerasa *Taq* colocando con cuidado la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra con un exceso de enzima.
- Para minimizar los indicadores de los controles, se requiere el cumplimiento estricto de las *therascreen KRAS RGQ PCR Kit Instrucciones de uso* con respecto a la mezcla correcta de los reactivos, lo cual debe garantizarse en cada paso de mezcla durante la preparación del ensayo.

Antes de comenzar

- Asegúrese de que el software Rotor-Gene Q *therascreen KRAS Assay Package* correspondiente a la versión del software Rotor-Gene esté instalado antes del primer uso del instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (consulte Appendix 2 B: Installation of the Rotor-Gene Q *therascreen KRAS Assay Package*).
- Antes de cada uso, todos los reactivos deben descongelarse por completo durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente (15-25 °C), mezclarse invirtiéndolos 10 veces y centrifugarse brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo. Debe garantizarse que los reactivos se mezclen correctamente durante la preparación del ensayo.
- Asegúrese de que las muestras estén completamente descongeladas antes de su uso.
- Asegúrese de que la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) esté a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de cada uso. Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

Procedimiento

1. Descongele por completo la mezcla de reacción para control (tubo CTRL), el agua exenta de nucleasas para el control sin molde (NTC) y el control positivo (PC) de KRAS a temperatura ambiente (15-25 °C) durante un mínimo de 1 hora.

Los tiempos de descongelación de los reactivos, de preparación de la PCR y de almacenamiento antes de iniciar el análisis se indican en Tabla 2.

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

Tiempo de descongelación		Temperatura de almacenamiento* posterior a la preparación de la PCR	Tiempo máximo de preparación de la PCR y de almacenamiento
Mínimo	Máximo		
1 hora	4,5 horas	Temperatura ambiente 15-25 °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.

Nota: La preparación de la PCR debe realizarse a temperatura ambiente.

Nota: Ponga la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) a temperatura ambiente (15-25 °C) al mismo tiempo que los demás reactivos (consulte "Almacenamiento y manipulación de los reactivos" en la página 19). Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

2. Mezcle los reactivos descongelados invirtiendo cada tubo 10 veces para evitar concentraciones localizadas de sales y, a continuación, centrifúguelos brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo. Las muestras también deben mezclarse invirtiéndolas 10 veces y, a continuación, deben centrifugarse brevemente para que el

contenido se deposite en el fondo del tubo de muestra.

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

Nota: Debe garantizarse que los reactivos se mezclen correctamente durante la preparación del ensayo.

3. Prepare suficientes mezclas maestras (mezcla de reacción para control [CTRL] más ADN polimerasa *Taq* [*Taq*]) según los volúmenes de Tabla 3 para lo siguiente:
- 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 para permitir un excedente suficiente para la preparación de la PCR

La mezcla maestra del ensayo de control contiene todos los componentes necesarios para la PCR, salvo la muestra.

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

Componente	Volumen
Mezcla de reacción para control (CTRL)	19,76 µl x (n + 1) *
ADN polimerasa <i>Taq</i> (<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 debe ser superior a 24 (más los controles), puesto que 24 es el número máximo de muestras por serie analítica.

Nota: Al preparar la mezcla maestra, el volumen necesario de mezcla de reacción para control (CTRL) se añade primero al tubo correspondiente y la ADN polimerasa *Taq* (*Taq*) se añade al final.

Nota: Pipetee la ADN polimerasa *Taq* colocando con cuidado la punta de la pipeta justo por debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra con un exceso de enzima.

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

Nota: Deje 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	2	–	–	–	–	–	–
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. Ajuste una pipeta a un volumen inferior al volumen total de la mezcla maestra de reacción y mezcle bien aspirando y expulsando el contenido por completo 10 veces.

Nota: Debe garantizarse que los reactivos se mezclen correctamente durante la preparación del ensayo.

6. Añada inmediatamente 20 µl de mezcla maestra a cada tubo de la tira para PCR.

Nota: Consulte Tabla 4 para ver la disposición de los tubos. Para la evaluación de las muestras de ADN, se debe añadir la mezcla maestra del ensayo de control a un tubo de PC, a un tubo de 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 (NTC) al tubo de NTC (posición del tubo 2) y tape el tubo.
8. Añada 5 µl de cada muestra de ADN a los tubos de muestras (posiciones de los tubos 3 a 26) y tápelos.
9. Añada 5 µl de KRAS Positive Control (PC) (control positivo para KRAS) al tubo de PC (posición del tubo 1) y tape el tubo.

Nota: Cada tubo debe contener un volumen de reacción total de 25 µl (20 µl de mezcla maestra preparada en 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 indicar la orientación de carga de los tubos en el 72-Well Rotor del instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

11. Invierta 4 veces los tubos tapados para mezclar la muestra y la mezcla de reacción.

Nota: Debe garantizarse que los reactivos se mezclen correctamente durante la preparación del ensayo.

12. Coloque todos los tubos de 4 tiras para PCR en las posiciones correspondientes del 72-Well Rotor de acuerdo con la disposición de la serie (Tabla 4) con las marcas para la orientación.

Nota: Si el rotor no está totalmente lleno, todas las posiciones no utilizadas del rotor deben llenarse con un tubo vacío tapado. De este modo, se garantiza que se mantenga la eficiencia térmica del instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

13. Coloque el rotor de 72 pocillos en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Asegúrese de que el anillo de bloqueo (suministrado con el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) esté colocado sobre el rotor para fijar los tubos durante el análisis.
14. Haga doble clic en el icono **therascreen KRAS Locked Template** del escritorio del ordenador portátil conectado al instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Figura 1) para iniciar el software Rotor-Gene Q.



Figura 1. El icono *therascreen KRAS QC Locked Template*.

15. La pestaña Setup aparece de forma predeterminada (Figura 2). Asegúrese de que el anillo de bloqueo esté correctamente colocado y marque la casilla **Locking Ring Attached** (Anillo de bloqueo sujeto). Cierre la tapa del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

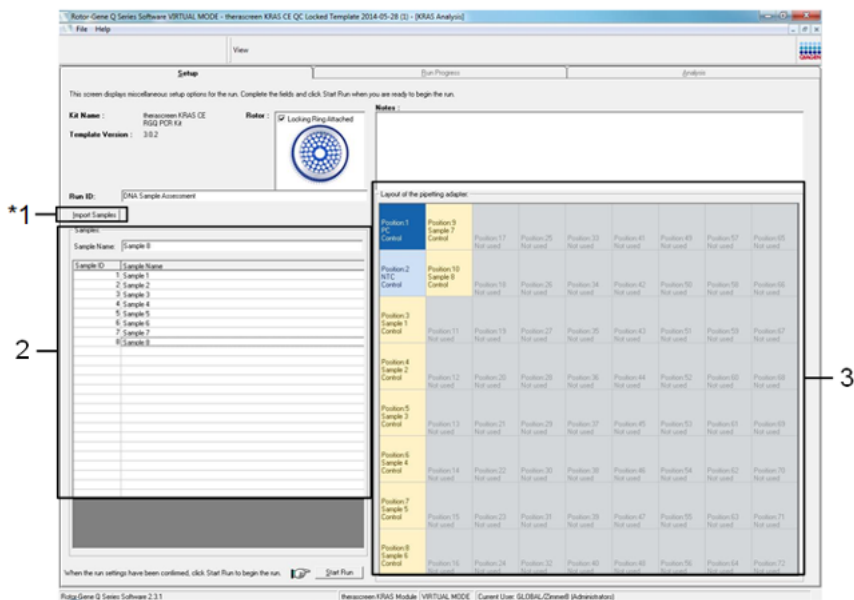


Figura 2. La pestaña Setup y la casilla Locking Ring Attached. 1 = pestaña "Setup" (Configuración), 2 = casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de bloqueo sujeto).

16. Introduzca el ID de la serie en el campo **Run ID** (ID de la serie) de acuerdo con su convención de nomenclatura local.
17. Introduzca el nombre de la muestra en el campo **Sample Name** (Nombre de la muestra) según su convención de nomenclatura local y pulse la tecla **Return** (Retorno).

Esto añadirá el nombre de la muestra a la lista de muestras a continuación y asignará a la muestra un **Sample ID** (ID de la muestra) (1, 2, 3, etc.). Además, el panel **Layout of the pipetting adapter** (Diseño del adaptador de pipeteo) situado a la derecha se actualizará para incluir el nombre de la muestra (Figura 3).

Como alternativa, los nombres de las muestras almacenados en formato *.smp (archivo de muestras de Rotor-Gene Q) o *.csv (valores separados por comas) se pueden importar 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**, compruebe que la adición del nombre de la muestra se haya resaltado mediante un cambio de color y que el nombre de la muestra se encuentre en la posición de la muestra (Figura 3).

Nota: Es posible que los nombres de las muestras con más de 8 caracteres no se muestren por completo en el panel **Layout of the pipetting adapter**.

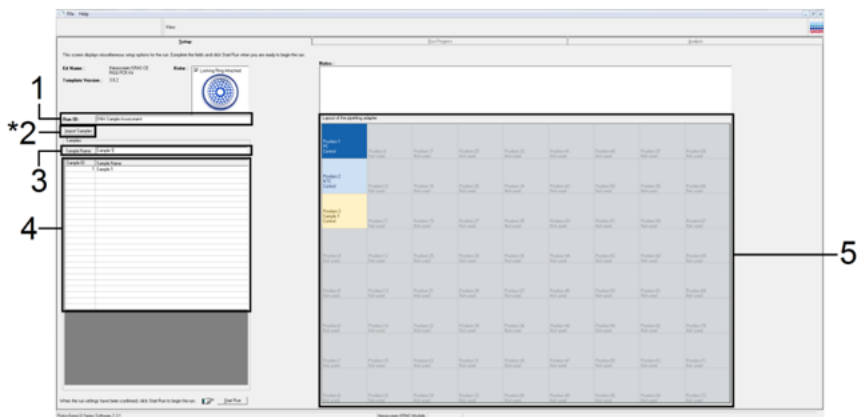


Figura 3. Introducción del Run ID y del Sample Name. 1 = campo de diálogo "Run ID", 2 = botón "Import Samples", 3 = campo de diálogo "Sample Name", 4 = Sample List, 5 = panel Layout of the pipetting adapter.

18. 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 **Sample Name** en la lista de muestras y la muestra seleccionada aparecerá en el campo **Sample Name**. Modifique el

nombre de la muestra según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla **Return** para cambiar el nombre.

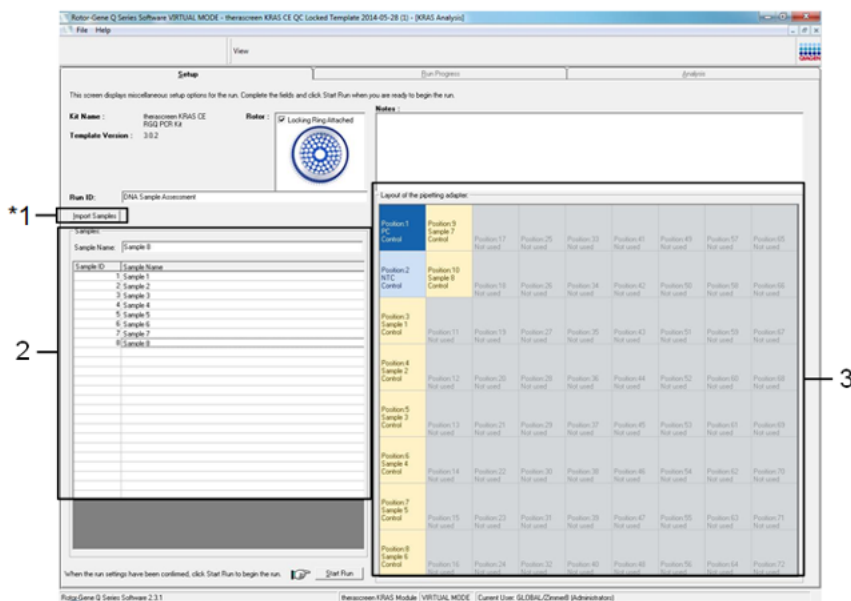


Figura 4. Introducción de nombres de muestra adicionales en el campo Sample Name. * 1 = Botón “Import Sample”, 2 = Campo de diálogo “Sample Name” y “Sample List”, 3 = panel “Layout of the pipetting adapter” con nombre de muestra adicional.

19. Cuando haya terminado de introducir todos los nombres de las muestras, compruebe que sean correctos. Añada la información adicional en el campo **Notes** (Notas) si es necesario y, a continuación, haga clic en **Start Run** (Iniciar la serie) (Figura 5).

Nota: Si queda alguna posición del rotor vacía, aparecerá un mensaje de advertencia (Figura 5 y Figura 6) 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** para continuar.

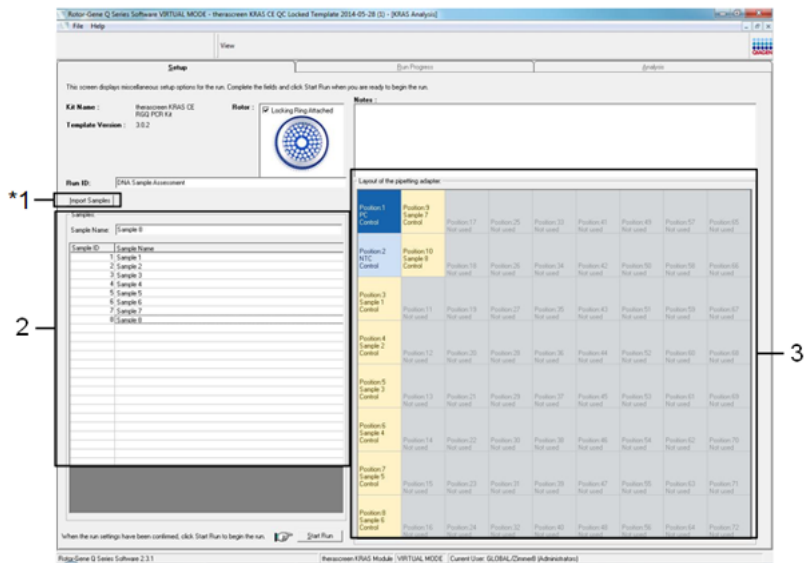


Figura 5. Campo “Notes”, “Start Run” y “Advertencia” sobre las posiciones sin utilizar del rotor.

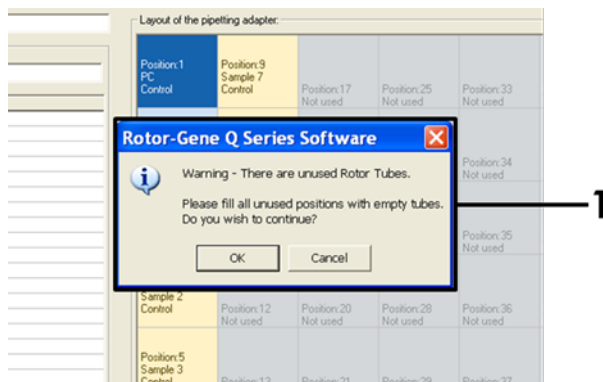


Figura 6. Advertencia sobre las posiciones sin utilizar del rotor.

20. Aparece el cuadro de diálogo 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).

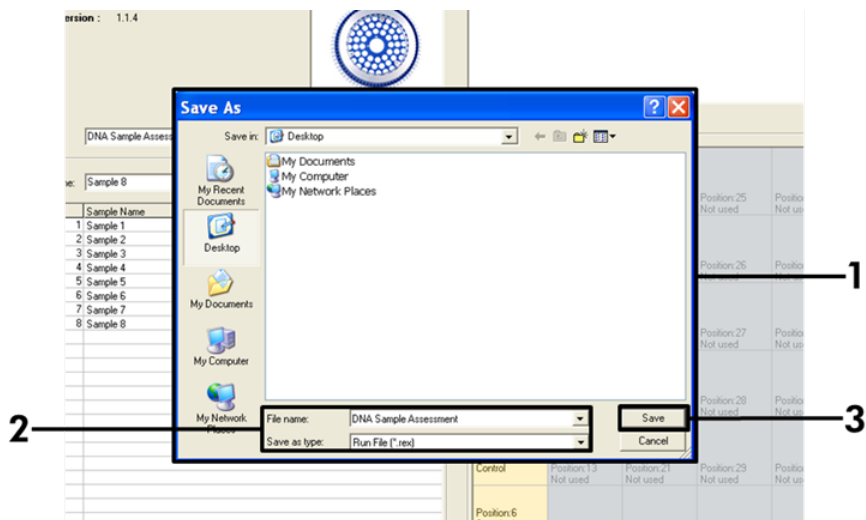


Figura 7. Guardado del archivo de ejecución. 1 = ventana "Save As", 2 = nombre del archivo y guardar como tipo de archivo *.rex, 3 = "Save".

Comienza la serie de PCR.

Nota: Cuando se inicia la serie, la pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie) se abrirá automáticamente para mostrar el registro de la temperatura y el tiempo de ejecución restante (Figura 8).

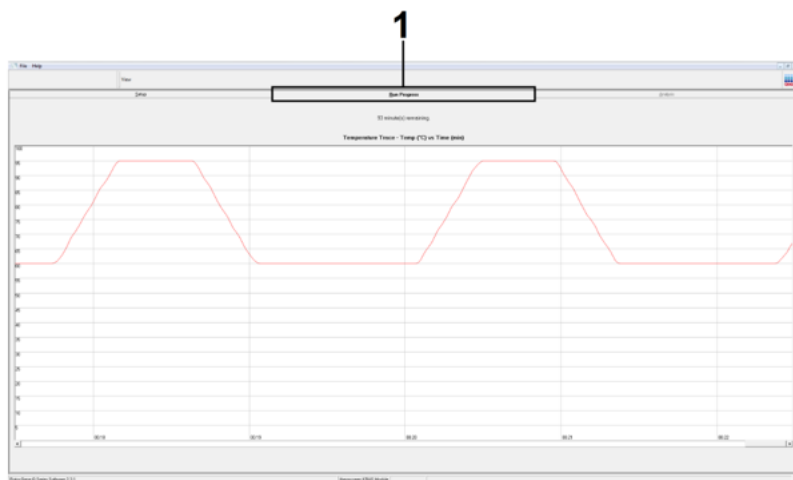


Figura 8. Pestaña "Run Progress".

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

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

Nota: En "Interpretación de los resultados" en la página 68 se presenta una explicación del método de cálculo.

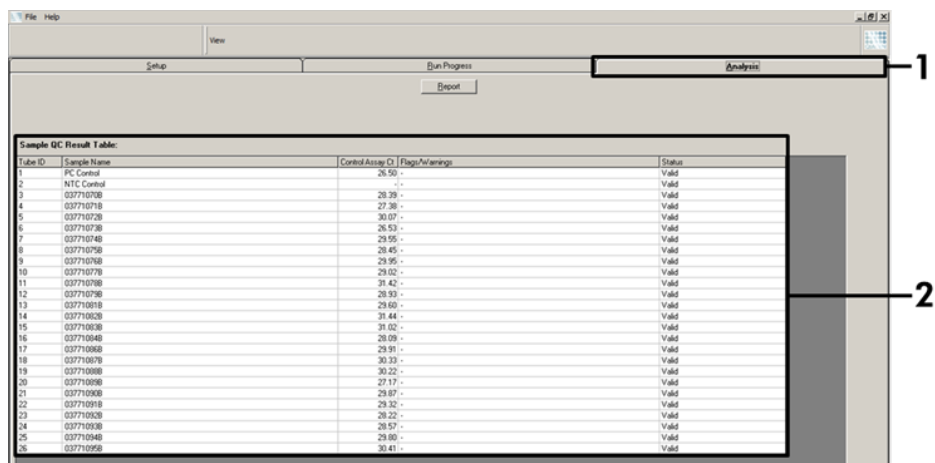


Figura 9. Pestaña Analysis e informe de resultados. 1 = pestaña "Analysis", 2 = tabla "Sample QC Result".

Nota: Los resultados de control se notificarán de la siguiente manera en la tabla Sample QC Result (Ejemplo de resultado de CC) (2 en Figura 9).

- **Run controls** (Controles de ejecución) (PC y NTC, posiciones de los tubos 1 y 2, respectivamente): se muestra un resultado "Valid" si los resultados se encuentran dentro de los rangos aceptables. De lo contrario, se indicará Invalid (No válido).
- **Sample Control reaction $C_T > 32.00$** (C_t de la reacción de control de la muestra $> 32,00$): se muestra un resultado "Invalid". 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 dispone de este (consulte "Interpretación de los resultados (manual)" en la página 56).

Protocolo: detección de mutaciones del *KRAS*

Este protocolo está destinado a la detección de mutaciones de *KRAS*.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Una muestra se puede analizar con los ensayos de mutación de *KRAS* una vez que haya superado la evaluación de la muestra.
- Para un uso eficaz del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, las muestras deben agruparse en lotes de siete (para completar el rotor de 72 pocillos). Los tamaños de lote más pequeños supondrán que se podrán analizar menos muestras con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- La muestra debe analizarse con todas las mezclas de reacción incluidas en el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- No agite en vórtex la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) ni ninguna mezcla que contenga ADN polimerasa *Taq*, ya que esto podría inactivar la enzima.
- Pipetee la ADN polimerasa *Taq* y coloque con cuidado la punta de la pipeta justo por debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra con un exceso de enzima.
- Para minimizar los indicadores de los controles y las muestras, es necesario cumplir estrictamente las indicaciones de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Instrucciones de uso con respecto a la mezcla correcta de los reactivos, lo cual debe garantizarse en cada paso de mezcla durante la preparación del ensayo.
- Asegúrese de que el software *therascreen* KRAS Assay Package correcto, correspondiente a la versión del software Rotor-Gene Q, esté instalado antes de usar por primera vez el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Antes de comenzar

- Antes de cada uso, todos los reactivos deben descongelarse por completo durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente (15-25 °C), mezclarse invirtiéndolos 10 veces y centrifugarse brevemente para que el contenido se acumule en el fondo del tubo.
- Asegúrese de que las muestras estén completamente descongeladas antes de su uso.
- Asegúrese de que la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) esté a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de cada uso. Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo. Debe garantizarse que los reactivos se mezclen correctamente durante la preparación del ensayo.

Procedimiento

1. Descongele por completo todos los tubos con mezcla de reacción, el agua exenta de nucleasas para el control sin molde (NTC) y el control positivo (PC) de KRAS a temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C) durante al menos 1 hora.

Los tiempos de descongelación de los reactivos, de preparación de la PCR y de almacenamiento antes de iniciar el análisis se indican en Tabla 5.

Tabla 5. Tiempo de descongelación, tiempos de configuración de la PCR y temperaturas de almacenamiento

Tiempo de descongelación

Mínimo	Máximo	Temperatura de almacenamiento* posterior a la preparación de la PCR	Tiempo máximo de preparación de la PCR y de almacenamiento
1 hora	4,5 horas	Temperatura ambiente 15-25 °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.

Nota: La preparación de la PCR debe realizarse a temperatura ambiente. El término "almacenamiento" se refiere al tiempo transcurrido entre la finalización de la preparación de la PCR y el inicio del ciclo de PCR en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Nota: Ponga la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) a temperatura ambiente (15-25 °C) al mismo tiempo que los demás reactivos (consulte "Almacenamiento y manipulación de los reactivos" en la página 19). Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

2. Una vez descongelados los reactivos, mézclelos invirtiendo cada tubo 10 veces para evitar concentraciones localizadas de sales y, a continuación, centrifúguelos brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo. Las muestras también deben mezclarse invirtiéndolas 10 veces y, a continuación, deben centrifugarse brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo de muestra.

Nota: Debe garantizarse que los reactivos se mezclen correctamente durante la preparación del ensayo.

3. Etiquete ocho tubos de microcentrífugadora libres de nucleasas (no suministrados) de acuerdo con cada mezcla de reacción correspondiente mostrada en la tabla siguiente. Prepare suficientes mezclas maestras (mezcla de reacción de control o de mutación [tubo CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL o 13ASP] más ADN polimerasa *Taq* [*Taq*]) para las muestras de ADN, una reacción de control positivo de KRAS (tubo PC) y una reacción de agua libre de nucleasas para el control sin molde (tubo NTC) según los volúmenes de la tabla. Incluya reactivos para 1 muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la preparación de la PCR.

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

Tabla 6. Mezcla maestra y volumen correspondiente*

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

* n = número de reacciones (muestras más 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 debe ser superior a 7 (más los controles), puesto que 7 es el número máximo de muestras que caben en una serie analítica.

Nota: Al preparar las mezclas maestras del ensayo, se añade primero el volumen necesario de la mezcla de reacción de control o de mutación al tubo correspondiente y la ADN polimerasa *Taq* (tubo *Taq*) se añade al final.

4. Coloque el número adecuado de tiras de 4 tubos para PCR (cada tira consta de 4 tubos) en el bloque de carga según el esquema de Tabla 7. Los números indican la posición en el bloque de carga y la posición final del rotor. No tape los tubos.

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

5. Ajuste una pipeta a un volumen inferior al volumen total de la mezcla de reacción y mezcle bien las mezclas maestras aspirando y expulsando el contenido por completo 10

veces.

Nota: Debe garantizarse que los reactivos se mezclen correctamente durante la preparación del ensayo.

Para la detección de mutaciones de *KRAS*, se deben añadir las mezclas maestras del ensayo a 8 tubos de PC, 8 tubos de NTC y 8 tubos para cada muestra de ADN.

6. Añada inmediatamente 20 µl de mezcla maestra a cada tubo de tiras para PCR correspondiente.

Nota: Consulte Tabla 7 para conocer la disposición de los tubos durante la preparación de las mezclas de reacción. Para detectar mutaciones de *KRAS*, se deben añadir mezclas maestras a 8 tubos de PC, 8 tubos de NTC y 8 tubos para cada muestra de ADN.

Tabla 7. Esquema de la serie analítica en el bloque de carga para la detección de mutaciones de *KRAS*

Ensayo	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	2	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.

7. Añada inmediatamente 5 µl de agua exenta de nucleasas para el control sin molde (NTC) a los tubos de NTC (posiciones de tubos 9-16) y tápelos.
8. Añada 5 µl de cada muestra de ADN a los tubos de muestras (posiciones de tubos 17-72) y tápelos.
9. Añada 5 µl de control positivo de KRAS (PC) a los tubos de PC (posiciones de tubos 1-8) y tápelos.
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) para indicar 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.

Nota: Debe garantizarse que los reactivos se mezclen correctamente durante la preparación del ensayo.
12. Coloque todas las tiras de 4 tubos para PCR en las posiciones correspondientes del rotor de 72 pocillos de acuerdo con el esquema de la serie analítica (Tabla 7) utilizando las marcas de orientación.

Nota: Se puede incluir un máximo de 7 muestras en cada serie de PCR. Si el rotor no está totalmente lleno, deben ocuparse todas las posiciones no utilizadas con tubos vacíos tapados. De este modo, se garantiza que se mantenga la eficiencia térmica del instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
13. Coloque el rotor de 72 pocillos en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Asegúrese de que el anillo de bloqueo (suministrado con el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) se coloque encima del rotor para asegurar los tubos durante el análisis.
14. Haga doble clic en el icono **therascreen KRAS Locked Template** del escritorio del ordenador conectado al instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Figura 10) para iniciar el software Rotor Gene Q.



Figura 10. El icono *theascreen* KRAS Locked Template.

15. La pestaña Setup aparece de forma predeterminada (Figura 11). Asegúrese de que el anillo de bloqueo esté correctamente colocado y marque la casilla **Locking Ring Attached** (Anillo de bloqueo sujeto). Cierre la tapa del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Como alternativa, los nombres de las muestras almacenados en formato *.smp (archivo de muestras de Rotor-Gene Q) o *.csv (valores separados por comas) se pueden importar 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**, compruebe que la adición del nombre de la muestra se haya resaltado mediante un cambio de color y que el nombre de la muestra se encuentre en la posición de la muestra (Figura 12).

Nota: Es posible que los nombres de las muestras con más de 8 caracteres no se muestren por completo en el panel **Layout of the pipetting adapter**.

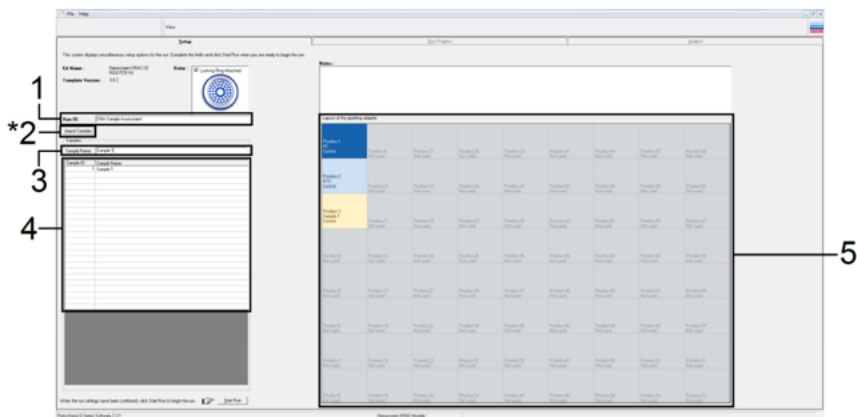


Figura 12. Introducción del Run ID y del Sample Name. 1 = campo de diálogo "Run ID", 2 = botón "Import Samples", 3 = campo de diálogo "Sample Name", 4 = Sample List, 5 = panel Layout of the pipetting adapter.

18. Repita el paso 16 para introducir los nombres de todas las muestras adicionales (Figura 13).

Nota: Para editar el nombre de una muestra, haga clic en **Sample Name** en la lista de muestras y la muestra seleccionada aparecerá en el campo **Sample Name**. Modifique el

nombre de la muestra según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla **Return** para cambiar el nombre.

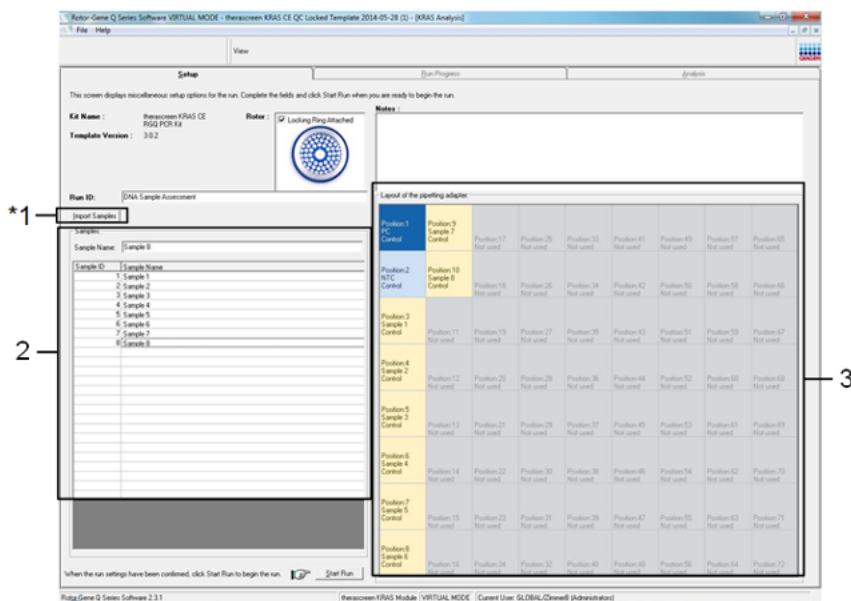


Figura 13. Introducción de nombres de muestra adicionales en el campo Sample Name. *1 = Botón "Import Sample", 2 = Campo de diálogo "Sample Name" y "Sample List", 3 = panel "Layout of the pipetting adapter" con nombre de muestra adicional.

19. Cuando haya terminado de introducir todos los nombres de las muestras, compruebe que sean correctos. Añada la información adicional en el campo **Notes** (Notas) si es necesario y, a continuación, haga clic en **Start Run** (Iniciar la serie) (Figura 14).

Nota: Si queda alguna posición del rotor vacía, aparecerá un mensaje de advertencia (Figura 14 y Figura 15) 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** para continuar.

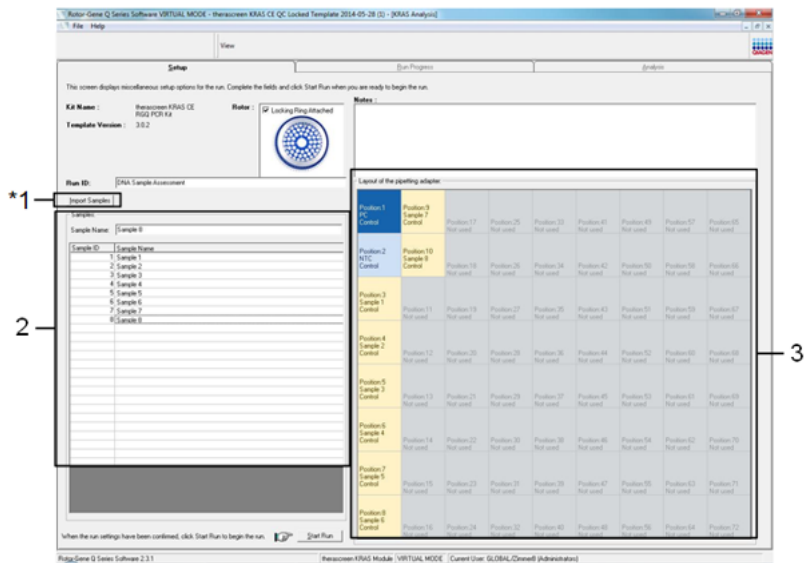


Figura 14. Campo “Notes”, “Start Run” y “Advertencia” sobre las posiciones sin utilizar del rotor.

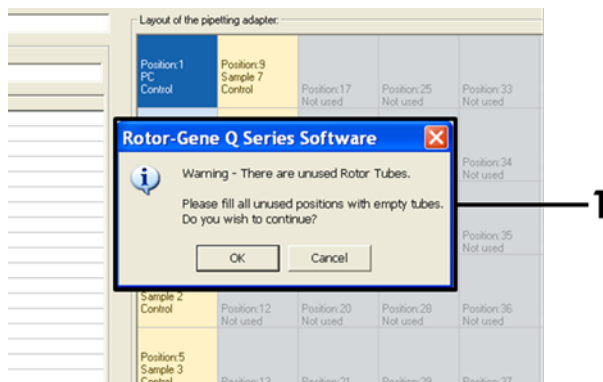


Figura 15. Advertencia sobre las posiciones sin utilizar del rotor.

20. Aparece el cuadro de diálogo 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 16).

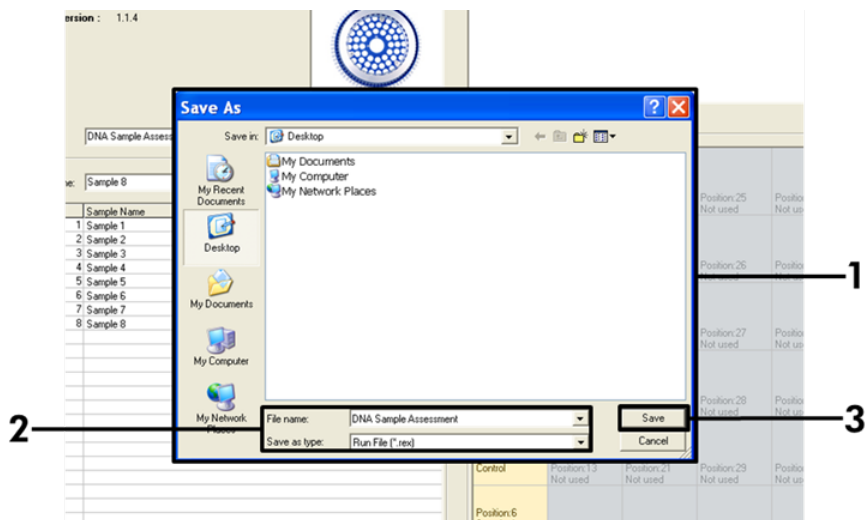


Figura 16. Guardado del archivo de ejecución. 1 = ventana "Save As", 2 = nombre del archivo y guardar como tipo de archivo *.rex, 3 = "Save".

Comienza la serie de PCR.

Nota: Cuando se inicia la serie, la pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie) se abrirá automáticamente para mostrar el registro de la temperatura y el tiempo de ejecución restante (Figura 17).

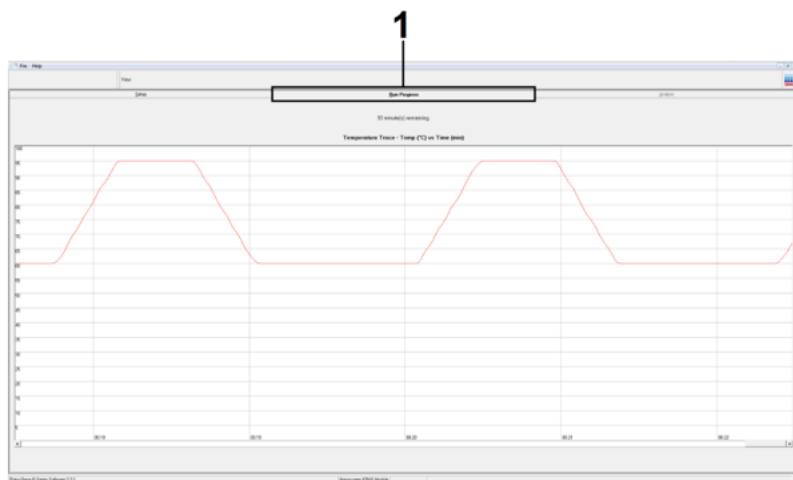


Figura 17. Pestaña “Run Progress”.

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

Nota: Si la pestaña “Analysis” no se abre, haga clic en la pestaña **Analysis** (Figura 18).

Nota: En "Interpretación de los resultados" en la página 68 se presenta una explicación del método de cálculo.

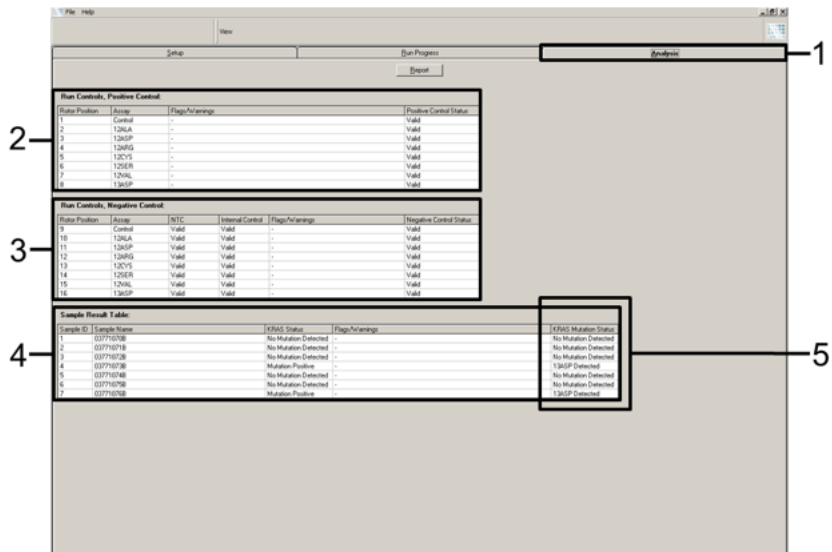


Figura 18. Pestaña “Analysis” e informe de resultados. 1 = pestaña “Analysis”, 2 = panel “Run Controls, Positive Control”, 3 = panel “Run Controls, Negative Control”, 4 = tabla “Sample Result”, 5 = columna “KRAS Mutation Status”.

Los resultados del ensayo se notificarán de la siguiente manera (Figura 18).

- **Run Controls, Positive Control panel** (panel Controles de la serie, control positivo): si los resultados se encuentran dentro del rango aceptable, en “Positive Control Status” aparecerá “Valid”; de lo contrario, aparecerá un resultado “Invalid”.
- **Run Controls, Negative Control panel** (panel Controles de la serie, control negativo): si tanto los resultados del NTC como los del control interno se encuentran dentro de los rangos aceptables, en “Negative Control Status” aparecerá “Valid”; de lo contrario, aparecerá un resultado “Invalid”.
- **Sample Result Table panel** (panel Tabla de resultados de las muestras): se informará de las

mutaciones específicas para las muestras con resultado positivo para mutación en la columna KRAS Mutation Status.

21. Para generar archivos de informe, haga clic en **Report** (Informe). Aparecerá la ventana "Report Browser" (Explorador de informes). Seleccione **KRAS Analysis Report** (Informe de análisis de KRAS) en Templates (Plantillas) y, a continuación, haga clic en **Show** (Mostrar) (Figura 19).

Note: Los informes se pueden guardar en otra ubicación en formato de archivos web haciendo clic en **Save As** (Guardar como) en la esquina superior izquierda de cada informe.

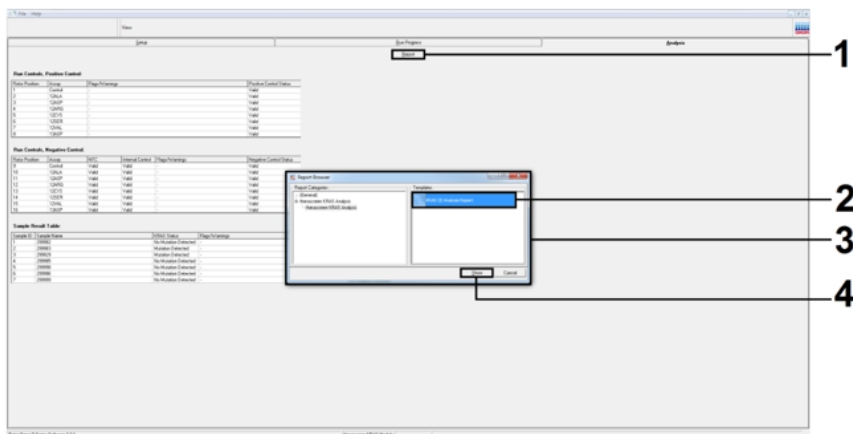


Figura 19. Selección de KRAS Analysis Report. 1 = Report (Informe), 2 = ventana Report Browser (Explorador de informes), 3 = selección de KRAS Analysis Report (Informe del análisis de KRAS), 4 = Show (Mostrar).

Nota solo para muestras de CPNM: para evitar la identificación de un resultado falso de la mutación G12C (12CYS), las muestras con los indicadores enumerados a continuación deben interpretarse como "Invalid". Para más información sobre la interpretación de los indicadores, consulte las acciones recomendadas de interpretación en Tabla 9, Tabla 10 y Tabla 11.

- SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT
- SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID
- SAMPLE_INT_CTRL_FAIL
- MUTATION__EARLY_CT
- SAMPLE_INVALID_DATA

Interpretación de los resultados (manual)

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

Configuración del análisis del software

1. Abra el archivo correspondiente con Software Rotor-Gene Q versión 2.3.5 o una versión posterior.
2. Si no ha asignado un nombre a las muestras antes de realizar el análisis, haga clic en **Edit Samples** (Editar muestras).
3. Introduzca los nombres de las muestras en la columna Name (Nombre).
4. Haga clic en **Analysis**. En la página de análisis, haga clic en **Cycling A. Yellow** (Ciclado A. amarillo) para ver el canal HEX.
5. Haga clic en **Named On** (Nombrado activado).
Nota: Esto garantiza que los pocillos vacíos no se incluyan en el análisis.
6. Seleccione **Dynamic Tube** (Tubo dinámico).
7. Seleccione **Linear Scale** (Escala lineal).
8. Haga clic en **Outlier Removal** e introduzca **10 %** en el campo **NTC Threshold**.
9. Establezca el umbral en **0,05** y compruebe los valores de HEX Ct.
10. En la página de análisis, haga clic en **Cycling A. Green** (Ciclo A. verde) para ver el canal FAM.
11. Compruebe que **Dynamic Tube** esté resaltado. Haga clic en **Linear Scale**.
12. Haga clic en **Outlier Removal** e introduzca **10 %** en el campo **NTC Threshold**.

13. Establezca el umbral en **0,05** y compruebe los valores de FAM Ct.
14. Para generar archivos de informe, haga clic en **Report**. Aparecerá la ventana "Report Browser" (Explorador de informes). Seleccione **KRAS Analysis Report** en Templates (Plantillas) y, a continuación, haga clic en **Show** (Figura 20).

Note: Los informes se pueden guardar en otra ubicación en formato de archivos web haciendo clic en **Save As** en la esquina superior izquierda de cada informe.

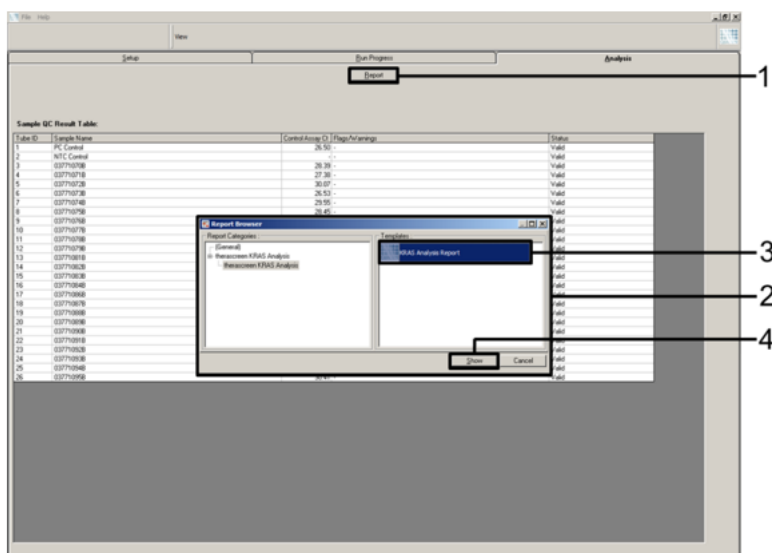


Figura 20. Selección de KRAS Analysis Report. 1 = Report (Informe), 2 = ventana Report Browser (Explorador de informes), 3 = selección de KRAS Analysis Report (Informe del análisis de KRAS), 4 = Show (Mostrar).

Análisis de los datos de valoración de las muestras

Análisis de control de la serie

Consulte el diagrama de flujo del análisis de control de la serie en Figura 21.

- **Negative control** (Control negativo): para asegurarse de que la mezcla de reacción no esté contaminada, el control sin molde no debe generar un valor de C_T en el canal verde inferior a 40. Para garantizar que la placa se haya configurado correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación de C_T 31,91-35,16 en el canal amarillo. Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos).
- **Positive control** (Control positivo): el KRAS Positive Control (PC) 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 se deben utilizar los datos de las muestras si se produjo un error en alguno de estos dos controles de análisis.

Siempre que ambos controles de la serie sean válidos, cada valor de C_T de la muestra debe estar dentro del rango de 21,92-32,00 en el canal verde. Si la muestra está fuera de este rango, se proporcionan las siguientes indicaciones.

Análisis de muestras: ensayo de control

- **Sample control assay C_T of <21.92** (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 límite inferior del rango de ensayo validado. Para detectar cada mutación en un nivel bajo, las muestras sobreconcentradas se deben diluir para que se encuentren en el rango 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 del gen KRAS). Es necesario diluir las muestras con el agua suministrada con el kit (agua exenta de nucleasas para la dilución [Dil.]).

- **Sample control assay C_T of >32** (C_t del ensayo de control de la muestra >32): se recomienda volver a extraer la muestra, ya que no habrá suficiente molde de ADN de partida para detectar todas las mutaciones con los valores de corte indicados para el ensayo.

Análisis de detección de mutaciones de KRAS

Análisis de control de la serie

Consulte el diagrama de flujo del análisis de control de la serie en Figura 21.

- **Negative control** (Control negativo): para asegurarse de que la mezcla de reacción no esté contaminada, el control sin molde no debe generar un valor de C_T en el canal verde inferior a 40. Para garantizar que la placa se haya configurado correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación de C_T 31,91-35,16 en el canal amarillo. Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos).
- **Positive control** (Control positivo): el KRAS Positive Control (PC) 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 se deben utilizar los datos de las muestras si se produjo un error en alguno de estos dos controles de análisis.

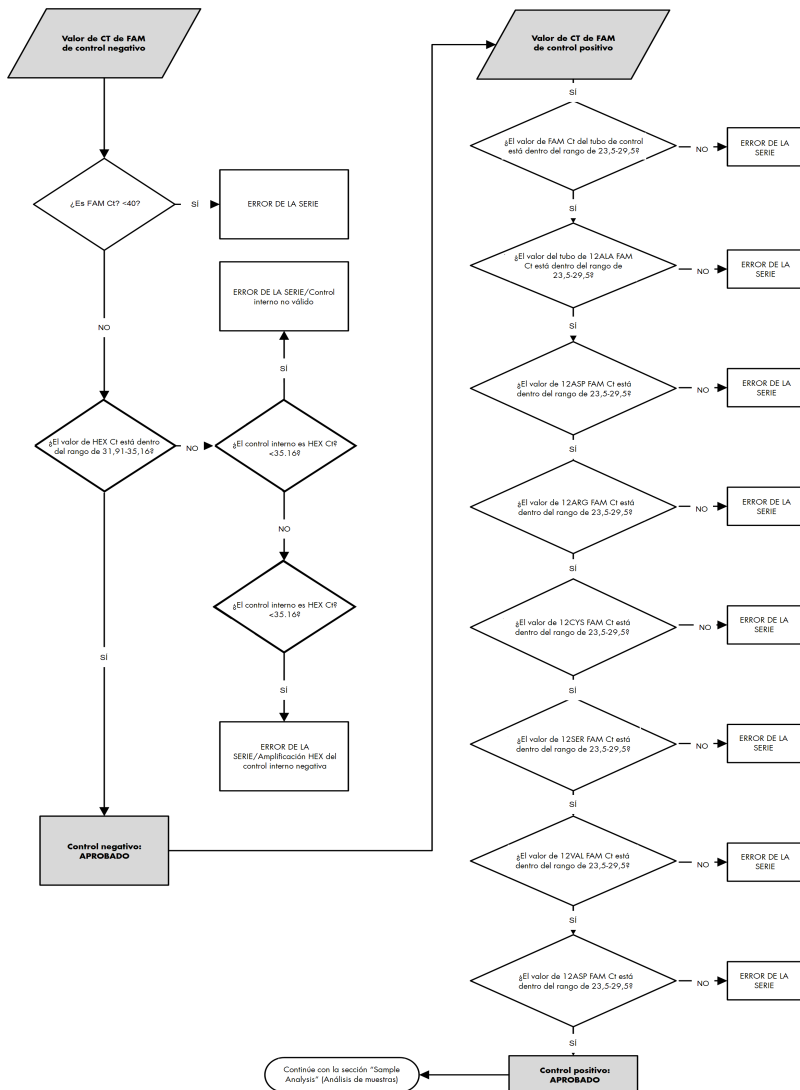


Figura 21. Organigrama del análisis de control de la serie.

Análisis de muestras

Consulte el diagrama de flujo de análisis de muestras (Figura 22).

Valor de FAM C_T del ensayo de control de la muestra

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

Si la muestra está fuera de este rango, se proporcionan las siguientes indicaciones.

- **Sample control assay C_T of <21.92:** las muestras con un C_T de control <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 rango mencionado anteriormente, partiendo de la base de que diluir a la mitad aumentará el C_T en 1. Es necesario diluir las muestras con el agua suministrada con el kit (agua exenta de nucleasas para la dilución [Dil.]).
- **Sample control assay C_T of >32:** interprete con precaución, ya que es posible que no se detecten las mutaciones de nivel muy bajo.

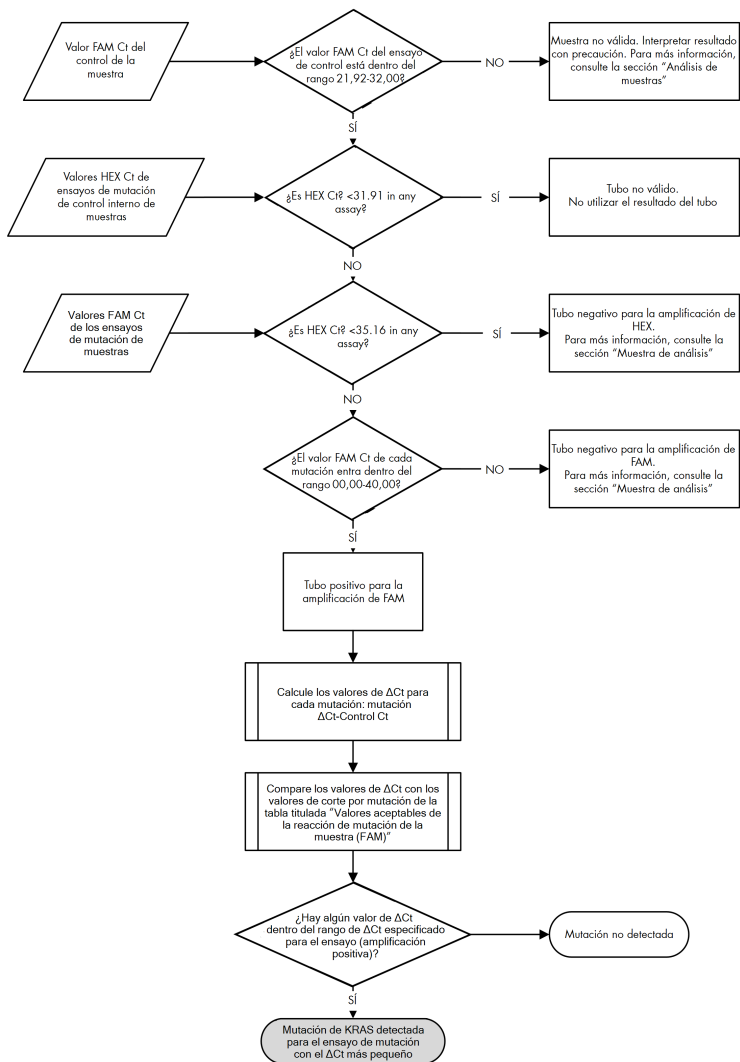


Figura 22. Organigrama del análisis de la muestra.

Valor de C_T de HEX de los ensayos de mutación con control interno de la muestra

Consulte el diagrama de flujo de análisis de muestras (Figura 22).

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

- Si el C_T del control interno se encuentra dentro del rango especificado (31,91-35,16), la amplificación de HEX es positiva.
- Si el C_T del control interno es superior al rango especificado (>35,16), la amplificación de HEX es negativa.
- Si el C_T del control interno es inferior al rango especificado (<31,91), el resultado no es válido.
- Si el fallo del control interno se debe a la inhibición de la PCR, la dilución de la muestra puede 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 muestras (Dil.).

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

Se deben comprobar los valores de FAM de las 7 mezclas de reacción con los valores indicados en Tabla 8.

Tabla 8. Valores de reacción de mutación de muestras aceptables (FAM)*

Ensayo	Rango de C _T aceptable	Rango de ΔC _T
12ALA	0,00-40,00	≤8,00
12ASP	0,00-40,00	≤6,60
12ARG	0,00-40,00	≤8,00
12CYS	0,00-40,00	≤8,00
12SER	0,00-40,00	≤8,00
12VAL	0,00-40,00	≤7,50
13ASP	0,00-40,00	≤7,50

*Los valores aceptables son los comprendidos entre los valores mostrados, ambos incluidos.

- Si el FAM C_T se encuentra dentro del rango especificado, el resultado es positivo para la amplificación de FAM.
- Si el C_T de FAM está por encima del rango especificado o si no hay amplificación, el resultado es negativo para la amplificación de FAM.
- Calcule el valor ΔC_T de cada tubo de mutación con amplificación de FAM positiva de la siguiente manera, asegurándose de que los valores C_T de mutación y de control correspondan a la misma muestra.

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

Compare el valor ΔC_T de la muestra con el punto de corte del ensayo en cuestión (Tabla 8) y asegúrese de aplicar el punto de corte correcto a cada ensayo.

El punto de corte es el valor por encima del cual una señal positiva posiblemente se deba a la señal de fondo del cebador ARMS en el ADN nativo. Si el valor ΔC_T de la muestra es superior al punto de corte, se clasifica como negativo o fuera de los límites de detección del kit.

Para cada muestra, las reacciones de mutación recibirán un estado de Mutation Detected (Mutación detectada), Mutation Not Detected (Mutación no detectada) o Invalid (No válido) según los siguientes criterios:

Mutation detected (Mutación detectada):

- Amplificación de FAM positiva y el ΔC_T es igual o inferior al valor de corte. Si se detectan varias mutaciones, la mutación notificada debe ser la que presente el valor de ΔC_T más bajo.

Mutation not detected (Mutación no detectada):

- La amplificación de FAM es positiva y el ΔC_T es superior al valor de corte.
- La amplificación de FAM es negativa y la amplificación de HEX (control interno) es positiva.

Invalid (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 Mutation Detected (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 en la amplificación de HEX y positiva en la amplificación de FAM en el mismo tubo, el resultado de mutación que se detecte 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 varias de las 7 reacciones de mutación son positivas. Si se detectan varias mutaciones, la mutación notificada debe ser la que presente el valor de ΔC_T más bajo.
- Mutación no detectada: las 7 reacciones de mutación son negativas.
- No válida: ninguna reacción de mutación es positiva y una o más reacciones de mutación son "Invalid".

Nota: El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit está diseñado para detectar mutaciones en el gen KRAS en una muestra de ADN. Cuando una muestra se clasifica como "mutación de KRAS detectada", solo debe notificarse una mutación específica. Si se detectan varias mutaciones, la mutación notificada 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 cebadores 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 varias de las reacciones de mutación no son válidas pero una o varias son positivas, la muestra todavía puede clasificarse como mutación de *KRAS* detectada, ya que hay una mutación presente. No obstante, es posible que la mutación específica indicada no sea precisa y se deba a la reactividad cruzada. Por lo tanto, la muestra solo se debe identificar como mutación de *KRAS* detectada.

- **Sample control reaction C_T <21.92:** se muestra "Invalid". 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 de 21,92-32,00. Una dilución 1:1 aumenta el valor de C_T en aproximadamente 1,0.
- **Sample control reaction C_T of 21.92-32.00:** se muestra "Valid"; la concentración de ADN es adecuada para el análisis de mutaciones.

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

Interpretación de los resultados

El Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package hace automáticamente el análisis y la identificación de las mutaciones en cuanto finaliza la serie. La siguiente información explica cómo el Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package hace el análisis y la identificación de las mutaciones.

Análisis e identificaciones de mutaciones

El ciclo de PCR en el que la fluorescencia de una determinada reacción cruza un valor umbral se define como el valor de C_T . Los valores de C_T indican la cantidad de ADN de entrada específico. Los valores de C_T bajos indican niveles de ADN de entrada más altos y los valores de C_T altos indican niveles de ADN de entrada más bajos. Las reacciones con un valor de C_T se clasifican como amplificación positiva.

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 limitado a números enteros) dentro del rango de 0-40.

Para el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, el valor umbral se ha fijado en 0,05 unidades de fluorescencia relativa. Este valor se configura en el *therascreen* KRAS Assay Package para ambos canales de fluorescencia Green y Yellow. El valor de umbral se definió 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 evalúan los controles de la serie (control positivo, NTC y controles internos) para garantizar que se cumplan los valores de C_T aceptables y que las reacciones se desarrollan correctamente.

Los valores de ΔC_T de la muestra se calculan como la diferencia entre el C_T del ensayo de mutación y el C_T del ensayo de control de la misma muestra. Las muestras se clasifican como positivas para la mutación si presentan un valor de ΔC_T inferior o igual al valor de ΔC_T de corte para ese ensayo. Por encima de este valor, la muestra puede contener un porcentaje de mutación inferior al que puede detectar el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (más allá del límite de los ensayos) o bien la muestra da negativo en la mutación, lo que se notificará como "No Mutation Detected" (No se detectó mutación).

La ausencia de amplificación en las reacciones de mutación se registrará como "No Mutation Detected". Se prevé que los valores de ΔC_T calculados a partir de la amplificación de fondo sean superiores a los valores de ΔC_T de corte, y la muestra se clasificará como "No Mutation Detected".

Los resultados del ensayo se mostrarán como "[mutation name] Detected" ([nombre de mutación] detectada), "No Mutation Detected", "Invalid" o, si falla un control de ensayo, "Run Control Failed". En el caso de las muestras positivas para la mutación, se indican las mutaciones específicas detectadas.

Para la interpretación de los indicadores generados por el Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, consulte "Indicadores del Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package" en la página siguiente.

Nota: En casos poco frecuentes, un tumor puede contener más de una mutación. En tales casos, se identificará la mutación que proporcione el valor de ΔC_T más bajo.

Indicadores del Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package

En función del uso previsto específico para las muestras de CCR y CPNM, existen acciones específicas asociadas a indicadores concretos. En las secciones siguientes se detallan las acciones para los indicadores de cada indicación.

Tabla 9. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package y acciones recomendadas

Marcador	Significado	Acción
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Ejecución de PCR no válida: FAM Ct fuera de rango para el control positivo en la reacción de control	Repita toda la serie de PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Serie de PCR no válida: FAM Ct fuera de rango para una o más reacciones de mutación.	Repita toda la serie de PCR.
PC_CTRL_INVALID _DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia del control positivo (mezcla de reacción para control).	Repita toda la serie de PCR.
PC _MUTATION_ INVALID_ DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia del control positivo (mezcla de reacción para la mutación)	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Serie de PCR no válida: control interno por encima del rango 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 rango para el control negativo	Repita toda la serie de PCR.

Tabla 9. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package y acciones recomendadas (continuación)

Marcador	Significado	Acción
NTC_INVALID_CT	Serie de PCR no válida: 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	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control negativo	Configure una PCR nueva para repetir las muestras relevantes.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Muestra no válida: FAM C _T demasiado bajo en el control de la muestra	Diluya la muestra para aumentar el valor de C _T del control. Esta dilución debe calcularse partiendo de la base de que una dilución 1:1 con el agua suministrada en el kit aumentará el C _T en 1,0. Una vez diluida la muestra, configure un nuevo ciclo de PCR para repetir la muestra.

Indicadores específicos para CPNM y CCR

Tabla 10 enumera los posibles indicadores que puede generar el Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, el significado de los indicadores y las acciones que deben llevarse a cabo.

Marcadores específicos para NSCLC

Tabla 10 enumera los posibles indicadores que puede generar el Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, el significado de los indicadores y las acciones que deben llevarse a cabo para las muestras de CPNM.

Tabla 10. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package y acciones recomendadas para las muestras de CPNM

Marcador	Significado	Acción
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _t demasiado alto (o ausencia de C _t) para el control interno (HEX), canal FAM negativo para mutación	Para evitar obtener un resultado falso de la mutación G12C (12CYS), el resultado debe interpretarse como no válido. Diluya la muestra restante en una proporción 1:8 con agua del tubo marcado como DIL y asegúrese de que el volumen final sea superior a 40 µl (p. ej., 10 µl de ADN y 70 µl de agua del tubo marcado como DIL); configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado no es válido en la repetición de la PCR, extraiga la muestra de secciones de FFPE nuevas. Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado no es válido, diluya la muestra restante en una proporción 1:8 con agua del tubo marcado como DIL y asegúrese de que el volumen final sea 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.

Tabla 10. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package y acciones recomendadas para las muestras de CPNM (continuación)

Marcador	Significado	Acción
SAMPLE_INT_CTRL_ EARLY_CT	Tubo de mutación no válido: HEX C _T demasiado bajo para la muestra (control interno)	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado no es válido en la repetición de la PCR, extraiga la muestra de secciones de FFPE nuevas (dos secciones). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado no es válido, configure una nueva serie de PCR para volver a analizar la muestra reextraída. 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_INVALID_ DATA	Tubo para mutación no válido: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control interno	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado no es válido en la repetición de la PCR, extraiga la muestra de secciones de FFPE nuevas (dos secciones). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado no es válido, configure una nueva serie de PCR para volver a analizar la muestra reextraída. 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.
MUTATION_EARLY_CT	Tubo de mutación no válido: FAM C _T demasiado bajo para la muestra.	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado no es válido en la repetición de la PCR, extraiga la muestra de secciones de FFPE nuevas (dos secciones). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado no es válido, configure una nueva serie de PCR para volver a analizar la muestra reextraída. 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.

Tabla 10. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q therascreen KRAS Assay Package y acciones recomendadas para las muestras de CPNM (continuación)

Marcador	Significado	Acción
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Una o más mutaciones de una muestra son válidas y positivas; al mismo tiempo, una o más mutaciones de la misma muestra no son válidas.	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado no es válido en la repetición de la PCR, extraiga la muestra de secciones de FFPE nuevas (dos secciones). Configure una nueva ejecución de PCR para analizar una extracción nueva. Si no es válida, configure una nueva ejecución de PCR para volver a analizar la muestra reextraída. 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_CTRL_FAIL	Muestra no válida: FAM C _T demasiado alto en la reacción de control de la muestra	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado no es válido en la repetición de la PCR, extraiga la muestra de secciones de FFPE nuevas (dos secciones). Configure una nueva serie de PCR para analizar la nueva extracción. Si el resultado no es válido, configure una nueva serie de PCR para volver a analizar la muestra reextraída. 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.

Indicadores específicos para CCR

Tabla 11 enumera los posibles indicadores que puede generar el Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, el significado de los indicadores y las acciones que deben realizarse para las muestras de CCR.

Tabla 11. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package y acciones recomendadas para las muestras de CCR

Marcador	Significado	Acción
SAMPLE_CTRL_FAIL	Muestra no válida: FAM Ct demasiado alto en la reacción de control de la muestra	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado no es válido al repetir la PCR, repita la extracción (≥ 1 secciones) siguiendo la indicación de que el área tumoral total sea de al menos 4 mm²; utilice secciones con un contenido tumoral >20 % por área para la extracción (sin macrodisección). Para las secciones con un contenido tumoral ≤ 20 % por área, realice una macrodisección de una o más secciones para garantizar un área tumoral total de al menos 4 mm². Configure una nueva ejecución de PCR para probar la extracción nueva; si no es válida, configure una nueva ejecución de PCR para volver a analizar la muestra reextraída. 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.

Tabla 11. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package y acciones recomendadas para las muestras de CCR (continuación)

Marcador	Significado	Acción
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T demasiado alto (o ausencia de C _T) para el control interno (HEX), canal FAM negativo para mutación	Si el estado de la muestra es válido: no se tomará ninguna medida. Si la muestra obtiene un estado no válido, configure una nueva serie de PCR para repetirla. Si el resultado no es válido al repetir la PCR, repita la extracción (≥1 secciones) siguiendo la indicación de que el área tumoral total sea de al menos 4 mm²; utilice secciones con un contenido tumoral >20 % por área para la extracción (sin macrodissección). Para las secciones con un contenido tumoral ≤20 % por área, realice la macrodissección de una o más secciones para garantizar que el área tumoral total sea de al menos 4 mm² Configure una nueva ejecución de PCR para probar la extracción nueva; si no es válida, configure una nueva ejecución de PCR para volver a analizar la muestra reextraída. 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.

Tabla 11. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package y acciones recomendadas para las muestras de CCR (continuación)

Marcador	Significado	Acción
SAMPLE_INT_CTRL_	Tubo de mutación no	Si el estado de la muestra es válido, no es preciso
EARLY_CT	válido: HEX C _T demasiado	realizar ninguna acción.
	bajo para la muestra	Si a la muestra se le asigna un estado no válido,
	(control interno)	configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra.
		Si el resultado no es válido al repetir la PCR, repita la
		extracción (≥1 secciones) siguiendo la indicación de que
		el área tumoral total sea de al menos 4 mm ² ; utilice
		secciones con un contenido tumoral >20 % por área para
		la extracción (sin macrodisección). Para las secciones con
		un contenido tumoral ≤20 % por área, realice una
		macrodisección de una o más secciones para garantizar
		un área tumoral total de al menos 4 mm ² .
		Configure una nueva ejecución de PCR para probar la
		extracción nueva; si no es válida, configure una nueva
		ejecución de PCR para volver a analizar la muestra
		reextraída. 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.

Tabla 11. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package y acciones recomendadas para las muestras de CCR (continuación)

Marcador	Significado	Acción
SAMPLE_INVALID_DATA	Tubo para mutación no válido: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control interno	Si el estado de la muestra es válido, no es preciso realizar ninguna acción. Si a la muestra se le asigna un estado no válido, configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si el resultado no es válido al repetir la PCR, repita la extracción (≥1 secciones) siguiendo la indicación de que el área tumoral total sea de al menos 4 mm²; utilice secciones con un contenido tumoral >20 % por área para la extracción (sin macrodissección). Para las secciones con un contenido tumoral ≤20 % por área, realice una macrodissección de una o más secciones para garantizar un área tumoral total de al menos 4 mm². Configure una nueva ejecución de PCR para probar la extracción nueva; si no es válida, configure una nueva ejecución de PCR para volver a analizar la muestra reextraída. 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.

Tabla 11. Significado de los indicadores de Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package y acciones recomendadas para las muestras de CCR (continuación)

Marcador	Significado	Acción
MUTATION_EARLY_CT	Tubo de mutación no válido: FAM C _T 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 no es válido tras repetir la serie de PCR, repita la extracción (≥ 1 secciones) siguiendo la indicación de que el área tumoral total sea de al menos 4 mm ² . Utilice secciones con un contenido tumoral >20 % por área para la extracción (sin macrodissección). Para las secciones con un contenido tumoral ≤20 % por área, realice una macrodissección de una o más secciones para garantizar un área tumoral total de al menos 4 mm ² . Configure una nueva ejecución de PCR para probar la extracción nueva; si no es válida, configure una nueva ejecución de PCR para volver a analizar la muestra reextraída. 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 una muestra son válidas y positivas; al mismo tiempo, una o más mutaciones de la misma muestra no son válidas	Ninguno

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” incluyan mutaciones de *KRAS* que no se pueden detectar con este ensayo (p. ej., 13CYS).
- La detección de mutaciones depende de la integridad de la muestra y de la cantidad de ADN amplificable presente en la muestra. El procedimiento debe repetirse en caso de que la evaluación inicial del ADN de la muestra indique que la cantidad no es suficiente o es demasiado elevada para el análisis de mutaciones.
- El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se utiliza en un procedimiento de 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. Extrema la precaución para evitar la contaminación de las muestras y los reactivos de la mezcla de reacción.
- Las mutaciones genéticas poco frecuentes (tasa de prevalencia <0,001 %) en las regiones diana del ensayo pueden presentar reacción cruzada con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y afectar a la precisión de los resultados.
- El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit no debe utilizarse para el diagnóstico de ninguna enfermedad.
- En el caso de las muestras de CCR, el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit solo está indicado para distinguir entre muestras nativas y mutadas.
- 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. Si más de una reacción mutante es positiva, el resultado es el que tenga el valor de ΔC_t más bajo.

- El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit solo está validado para muestras FFPE en tejido de CCR y tejido de CPNM.
- El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit solo está validado para su uso con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Solo el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM se ha validado para su uso con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Características de rendimiento

Rendimiento analítico

Las características de rendimiento específicas del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se determinaron mediante estudios con muestras de tejido FFPE obtenidas de pacientes con CCR y pacientes con CPNM. Los métodos de obtención de muestras de CPNM incluyeron la punción con aguja gruesa (CNB), la aspiración con aguja fina (FNA) y la resección (RES). Para cada tipo de muestra, se utilizaron 8 líneas celulares humanas FFPE, de las cuales 7 presentan mutaciones de *KRAS* conocidas detectadas por el ensayo y un *KRAS* nativo (es decir, sin mutaciones en los codones 12 y 13). El estado mutacional de las muestras se ha confirmado mediante la secuenciación bidireccional de Sanger.

Punto de corte

Mediante un método que sigue las directrices de la norma CLSI EP17-A (2004) (8), se analizaron 220 muestras FFPE para establecer los valores de corte del ensayo. El rango de Ct de la reacción de control se estableció entre 21,92 y 32,00. Los valores de corte, que se basan en el Ct de la reacción de control restado del Ct de las reacciones mutantes (ΔC_t), se muestran en Tabla 12.

Tabla 12. 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 evaluar el rendimiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit en ausencia de molde de mutación positiva y para garantizar que una muestra en blanco no genere una señal analítica que pueda indicar una concentración baja de mutación, se evaluaron muestras sin molde. Los resultados no mostraron valores de Ct detectables de control o mutantes en ninguno de los tubos de reacción de mutación o de control (todos los valores de Ct del control interno fueron válidos).

Comparación con el método de referencia analítico: CCR

Se hicieron dos estudios para demostrar la concordancia en el estado de mutación de las muestras de CCR analizadas con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit en relación con la secuenciación bidireccional. Un total de 137 de las muestras de FFPE generaron resultados válidos tanto con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit como con la secuenciación bidireccional.

Los resultados globales se muestran en Tabla 13. Tabla 14 muestra el análisis de concordancia entre el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y la secuenciación bidireccional.

Tabla 13. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit frente a la secuenciación bidireccional de Sanger

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

Tabla 14. Análisis del grado de concordancia

Medida de concordancia	Frecuencia (%)	Intervalo de confianza (IC) del 95 %
Porcentaje de concordancia global	132/137 (96,35)	92,69-98,21
Porcentaje de concordancia positiva	52/54 (96,30)	89,41-98,77
Porcentaje de concordancia negativa	80/83 (96,39)	91,30-98,55

Se evaluó un segundo conjunto de muestras exclusivo para complementar los datos del primer estudio. Se recopilaron 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 en 247 muestras con resultados válidos tanto de secuenciación bidireccional como de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Hubo 9 muestras discordantes. En general, la concordancia fue del 96,4 %. Los datos respaldan el rendimiento preciso de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (Tabla 15 y Tabla 16).

Tabla 15. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit frente a la secuenciación bidireccional de Sanger (segundo estudio)

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

Tabla 16. 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: CPNM

Para demostrar la concordancia en el estado mutacional global de las muestras de CPNM analizadas con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit en comparación con la secuenciación bidireccional de Sanger, en este estudio se utilizaron muestras clínicas de CPNM fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE) obtenidas mediante RES, CNB o FNA. Se extrajo el ADN de cada muestra antes de realizar las pruebas 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 para el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y para la secuenciación bidireccional de Sanger, con 340 muestras con resultados concordantes.

La concordancia entre el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y la secuenciación bidireccional se muestra en Tabla 17. Dos muestras arrojaron resultados de mutación doble mediante secuenciación bidireccional de Sanger. Dado que una mutación coincidía con el resultado de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, estas muestras se clasificaron como concordantes para el análisis de concordancia general, concordancia positiva y concordancia negativa (Tabla 18).

Tabla 17. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit frente a secuenciación bidireccional de Sanger

Identificación de mutaciones con el método de secuenciación bidireccional											
		Neg.	12ALA	12ALA_ 12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12CYS_ 12VAL	12VAL	13ASP	Total
Identificación del <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativo	261	–	–	–	–	–	–	–	1	262
	12ALA positivo	1	4	1	–	–	–	–	–	–	6
	12ARG positivo	–	–	–	3	–	–	–	–	–	3
	12ASP positivo	4	–	–	–	14	–	–	–	–	18
	12CYS positivo	6	–	–	–	–	35	–	–	–	41
	Positivo 12SER	2	–	–	–	–	–	–	–	–	2
	12VAL positivo	5	–	–	–	–	–	1	17	–	23
	13ASP positivo	1	–	–	–	–	–	–	–	4	5
Total		280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

Tabla 18. Análisis del grado de concordancia

Medida de acuerdo	Frecuencia (%)	Intervalo de confianza (IC) del 95 %
Porcentaje de concordancia general	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 (LoD)

El rango de funcionamiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se basa en la cantidad de ADN amplificable de la muestra, determinada por el valor de Ct de la reacción de control. El rango de entrada establecido para el ensayo se define mediante el rango preespecificado de Ct de control de 21,92-32,00. El LoD es el porcentaje mínimo de ADN mutante que se puede detectar en un fondo nativo cuando el ADN amplificable total se encuentra dentro del rango de entrada establecido y sigue estando por debajo del valor de corte del umbral de ΔCt .

CCR

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

Las declaraciones de LoD obtenidas con líneas celulares FFPE cuando el valor de Ct de entrada está comprendido aproximadamente entre 22 y 27 Ct se muestran en Tabla 19. En el extremo inferior del rango de entrada de Ct, la sensibilidad del ensayo disminuye. Es posible que la cantidad de ADN de entrada no contenga copias suficientes para mantener las mismas proporciones porcentuales entre el ADN nativo y el mutante observadas en los puntos alto y medio del rango de trabajo.

Tabla 19. Valores de LoD para cada ensayo de mutación con líneas celulares FFPE

Ensayo	LoD C ₉₅ (porcentaje de ADN mutante en ADN de tipo natural)
12ALA	0,8
12ASP	6,4

Tabla 19. Valores de LoD para cada ensayo de mutación con líneas celulares FFPE (continuación)

Ensayo	LoD C ₉₅ (porcentaje de ADN mutante en ADN de tipo natural)
12ARG	2,6
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

CPNM

El LoD de los ensayos *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se determinó y verificó mediante tejido de CCR. Estos resultados de LoD se han vuelto a verificar para tejido de CPCNP mediante líneas celulares FFPE y muestras clínicas FFPE de CPCNP.

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

En la parte 2, se analizaron 96 réplicas de muestras clínicas FFPE de CPNM, que representaban cada una de las mutaciones con los tres métodos de adquisición (RES, 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 mostraron una detección del 95,8 % en el LoD.

Esto demuestra que el valor del LoD determinado anteriormente se ha verificado para todos los ensayos de mutación al evaluar tejido de CPNM y muestras clínicas FFPE de CPNM, líneas celulares FFPE y correspondientes a cada paciente.

Cantidad de ADN y linealidad

Efecto de la concentración de ADN de partida en los valores de ΔC_t

Cuando las muestras con diferentes niveles de ADN total contienen la misma proporción de ADN mutante, se espera que los valores de ΔC_t medidos se mantengan constantes. El objetivo del estudio era demostrar que el rendimiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit es coherente en todo el rango de cantidad de ADN total (C_T de control) del ensayo. Se utilizó ADN extraído de ocho líneas celulares FFPE para preparar grupos de ADN con el valor de C_t de la reacción de control más bajo posible. A continuación se diluyeron los stocks de ADN concentrado para crear ADN para todo el intervalo de funcionamiento (un total de 5 diluciones incluyendo el stock concentrado inicial).

Se preparó material suficiente para realizar 6 réplicas en cada uno de los puntos del intervalo de funcionamiento. El rango de dilución para cada reacción de mutación y el valor medio de ΔCt obtenido a partir de los resultados se muestran en la Tabla 20. Los valores de ΔCt globales son coherentes en todo el rango de funcionamiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit de todos los ensayos, lo que demuestra que el nivel de ADN no repercutirá en la exactitud de la identificación de mutaciones en las muestras.

Tabla 20. Efecto de la cantidad de ADN sobre los valores de ΔCt en el rango de Ct de la reacción de control de entrada: estirpes celulares FFPE de CCR

ΔCt					
Ensayo	Dilución 1 ~20-21 Ct	Dilución 2 ~23-24 Ct	Dilución 3 ~26-27 Ct	Dilución 4 ~29-30 Ct	Dilución 5 ~32-33 Ct
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 21. Efecto de la cantidad de ADN de entrada sobre los valores de ΔCt en el rango de Ct de la reacción de control de entrada: muestras clínicas de FFPE de CPNM y de líneas celulares

ΔCt					
Ensayo	Dilución 1 ~20-21 Ct	Dilución 2 ~23-24 Ct	Dilución 3 ~26-27 Ct	Dilución 4 ~29-30 Ct	Dilución 5 ~32-33 Ct
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31

Tabla 21. Efecto de la cantidad de ADN de entrada sobre los valores de ΔC_t en el rango de C_t de la reacción de control de entrada: muestras clínicas de FFPE de CPNM y de líneas celulares (continuación)

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

* No se obtuvo ningún C_t de la reacción de mutación debido a la baja concentración de ADN; por lo tanto, no se calculó ningún ΔC_t .

Linealidad/eficiencia de amplificación en función de la entrada de ADN

Se demostró la linealidad y la eficiencia de amplificación de la PCR para cada reacción de mutación, en relación con la reacción de control, en todo el rango de funcionamiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. La eficiencia de amplificación de CPNM se calculó para cada una de las reacciones de mutación y la reacción de control como $[10(-1/\text{pendiente})] - 1$. La eficiencia de amplificación de CCR se calculó para cada una de las reacciones de mutación y la reacción de control como $[2(-1/\text{pendiente})] - 1$.

La eficiencia de amplificación del control en comparación con la reacción de mutación indica que el ΔC_T y, por tanto, la identificación de la mutación, son coherentes en todo el rango de funcionamiento del ensayo. En la Tabla 22 (Muestras de CCR) y la Tabla 24 (Muestras de CPNM) se muestra un resumen de los datos.

Tabla 22. Eficiencia de la amplificación en las reacciones de control y de mutación: líneas celulares de CCR

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

Tabla 23. Eficiencia de la amplificación en reacciones de control y de mutación: muestras clínicas FFPE de CPNM y muestras FFPE de líneas celulares

Muestra	Eficiencia de amplificación
12ALA	1,008
12ASP	1,036
12ARG	0,962
12CYS	0,996
12SER	1,092
12VAL	0,909
13ASP	1,008

Tabla 24. Eficiencia de amplificación en reacciones de control y de mutación: muestras de CPNM

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)
12ALA	C _T de control	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11
	12ALA C _T	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93
12ASP	C _T de control	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05
	12ASP C _T	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,99	-0,96
12ARG	C _T de control	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08
	12ARG C _T	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95
12CYS	C _T de control	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08
	12CYS C _T	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99
12SER	C _T de control	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02
	12SER C _T	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94

Tabla 24. Eficiencia de amplificación en reacciones de control y de mutación: muestras de CPNM (continuación)

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)
12VAL	C _T de control	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01
	12VAL C _T	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88
13ASP	C _T de control	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04
	12ASP C _T	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88

Linealidad/eficiencia de amplificación como función del porcentaje de mutación

CPNM

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de una muestra positiva para mutación diluida en serie sobre la eficiencia de amplificación a lo largo de todo el rango de funcionamiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, empezando por los niveles de entrada de Ct de aproximadamente 22-23 Ct.

En este estudio, se utilizó ADN extraído de nueve muestras de CPNM FFPE (4 líneas celulares y 5 clínicas). Se diseñó para evaluar el efecto de la dilución en serie de una muestra positiva para mutación sobre la eficiencia de amplificación mediante el análisis de muestras con distintos porcentajes de mutación a un nivel elevado de entrada de ADN (reacción de control de aproximadamente 23 C_t). El ADN procedente de muestras clínicas agrupadas de CPNM en FFPE y de líneas celulares FFPE se diluyó hasta alcanzar densidades ópticas correspondientes a valores de C_t de la reacción de control de aproximadamente 22-23 C_t. El ADN mutante se diluyó en serie al doble en ADN nativo normalizado para crear una serie de 5 diluciones por muestra de ADN mutante con distintos porcentajes de mutación (con dianas del 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % y 6,25 % de mutante).

Las eficiencias de amplificación del ADN nativo en relación con el ADN mutante presente en una muestra no influyeron en los valores de ΔC_T y, por lo tanto, la identificación de mutaciones no se vio afectada.

CCR

Los extractos de ADN de las líneas celulares de CCR en FFPE se evaluaron inicialmente mediante lecturas de LoD antes de realizar la PCR con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. A continuación, se prepararon las reservas de ADN para un C_T de la reacción de control correspondiente a aproximadamente un C_T . 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 datos de C_T y ΔC_T para cada mutación en cada punto 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 $\log_2$. El estudio mostró que la dilución de las mutaciones en un fondo con una concentración constante de ADN nativo dio lugar a eficiencias de amplificación que no variaron significativamente con respecto a los valores determinados en el estudio de linealidad anterior.

Sustancias interferentes

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de las sustancias potencialmente interferentes en el rendimiento del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Esto se llevó a cabo mediante el análisis del impacto de cada sustancia en los valores de ΔC_T y el estado de la mutación de las muestras de prueba mediante experimentos de adición a varias concentraciones. 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 que se espera encontrar en condiciones de uso normales, ninguna de las sustancias potencialmente interferentes evaluadas afecta a la capacidad del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit para distinguir entre muestras con mutación y sin mutación.

Además del estudio de sustancias interferentes, se evaluó el posible efecto de la necrosis en muestras clínicas de CCR para determinar si los niveles elevados de tejido necrótico en las muestras tumorales afectan a la capacidad 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 proporcionaron resultados válidos concordantes con la secuenciación bidireccional de Sanger. Solamente un resultado no fue válido debido a un volumen de ADN insuficiente.

También se evaluó el posible efecto de la necrosis en muestras clínicas de CPNM para determinar si los altos niveles de tejido necrótico en las muestras tumorales afectan a la capacidad de generar datos válidos. Este estudio demostró que el porcentaje de tumor o necrosis de la muestra no influye en el valor de C_T ni en el valor de ΔC_T entre los distintos métodos de obtención (CNB, RES o FNA).

Se realizó un estudio adicional para evaluar el impacto de la hemoglobina (Hb) en el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. En este estudio se utilizaron muestras clínicas de resección de CPNM obtenidas para las mutaciones 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL, 12CYS y 13ASP. No se evaluó ninguna muestra clínica de 12SER debido a la rareza de la mutación. Se incorporó una muestra clínica de FFPE de *KRAS* nativo al conjunto de muestras del estudio para evaluar posibles interferencias en las muestras con un estado negativo para la mutación. Las muestras de ensayo se enriquecieron con Hb en dos concentraciones diferentes: la mitad del arrastre máximo previsto (0,5x) y el arrastre máximo previsto (1x). La concentración de ensayo recomendada (1x) se tomó de la norma CLSI EP07-A2 como 2 µg/µl. Este estudio demostró que la detección de las mutaciones 12ASP, 12ARG, 12VAL, 12CYS y 13ASP mediante el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit no se ve afectada por la hemoglobina, que

podría actuar como factor de interferencia. Sin embargo, la detección de la mutación 12ALA mediante el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se ve afectada a una concentración de 0,50 µg/µl de Hb o superior.

Contaminación cruzada

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

- 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 estándares de FFPE: el estándar nativo y el estándar 12ALA (puesto que la reacción 12ALA es la reacción con el LoD [límite de detección] 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 consta de 8 reacciones independientes, que incluyen una única reacción de control que detecta una región no polimórfica del gen *KRAS* y 7 reacciones específicas de mutación. No existe ninguna reacción que mida específicamente la secuencia de *KRAS* de tipo natural en el codón 12 o 13. El resultado No Mutation Detected para *KRAS* (es decir, tipo nativo) se determina por la ausencia de cualquiera de las 7 mutaciones que dan lugar a un resultado positivo de mutación.

Por lo tanto, es necesario demostrar el grado de amplificación inespecífica o reactividad cruzada que se produce en cada reacción con cantidades excesivas de ADN del *KRAS* nativo para garantizar que no se produzcan resultados falsos positivos. Del mismo modo, se evalúa la amplificación inespecífica para las mutaciones de *KRAS* que no se espera detectar mediante este ensayo. Esto demuestra que el grado de reactividad cruzada entre las reacciones mutantes no da lugar a identificaciones de mutación erróneas en presencia de cantidades excesivas de ADN mutante. Dado que la entrada de ADN para este ensayo se basa en el rango de Ct de control (21,92-32,00), la concentración más alta de entrada de ADN se basa en tener un valor de Ct de control de aproximadamente 22.

Amplificación inespecífica/reactividad cruzada: ADN de *KRAS* de tipo natural

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 de líneas celulares FFPE nativas y 60 muestras de CPNM con el nivel de entrada de ADN amplificable de mayor concentración mediante el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Los valores de Ct del control fueron de aproximadamente 22-23. Los resultados demostraron que los valores de Δ Ct superaban los valores de corte establecidos y que al menos el 95 % de las réplicas nativas se identificaron correctamente.

Amplificación inespecífica/reactividad cruzada/exclusividad: ADN de KRAS positivo para la mutación

Se analizaron muestras mutantes con una concentración alta de ADN de partida frente a todas las mezclas de reacción. Se prepararon muestras de ADN a partir de cada una de las líneas celulares FFPE de CCR y CPNM de modo que el Ct de la reacción de control correspondiera a 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 estirpe celular.

Los valores de ΔCt medios presentados en Tabla 25 y Tabla 26 demuestran que existe reactividad cruzada entre las reacciones mutantes. En todos los casos, los resultados muestran que se identificó la mutación correcta con la reacción de mutación correspondiente (es decir, el valor de ΔCt más bajo fue la identificación de la mutación correcta). El resto de los casos de prueba no se detectaron o quedaron fuera del umbral de ΔCt .

Tabla 25. Reactividad cruzada entre reacciones de mutación mediante ADN de líneas celulares FFPE de CCR en el rango de entrada alto

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

Tabla 25. Reactividad cruzada entre reacciones de mutación mediante ADN de líneas celulares FFPE de CCR en el rango de entrada alto (continuación)

ADN mutado	Δ Ct del ensayo						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
13ASP	NA	13,29	13,89	NA	NA	14,36	4,5*

NA: sin reacción cruzada

* Valores de Δ Ct de reacciones emparejadas.

† Δ Ct de reacciones con reactividad cruzada por debajo del valor de corte.

Tabla 26. Reactividad cruzada entre las reacciones de mutación mediante ADN de líneas celulares FFPE de CPNM en el rango de entrada alto

ADN mutado	Δ Ct del ensayo						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	1,31*	12,8	NA	5,01†	2,26†	5,57†	12,65
12ASP	12,61	1,66*	NA	NA	NA	10,3	12,69
12ARG	12,98	11,08	0,81*	11,24	NA	12,66	12,62
12CYS	NA	12,22	7,84†	0,56*	NA	13,06	11,84
12SER	NA	12,87	13,21	NA	1,93*	13,25	12,93
12VAL	5,93†	14,29	NA	NA	13,14	0,45*	12,39
13ASP	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,02*

NA: sin reacción cruzada

* Valores de ΔCt de reacciones emparejadas.

† ΔCt de las reacciones con reactividad cruzada por debajo del valor de corte.

Repetibilidad y reproducibilidad

La precisión del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se determinó mediante un protocolo que incorporaba aspectos de las normas CLSI EP12-A y EP5-A2 (21, 22). 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, con dos operarios en cada uno de los tres centros que analizaron todas las muestras y los controles con tres lotes de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, cada día durante cinco días, con dos series al día y con dos réplicas de cada muestra en cada serie. Los valores de Ct y Δ Ct obtenidos para cada reacción en cada muestra también se analizaron mediante un análisis de componentes de varianza.

La reproducibilidad del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se demostró para muestras con un nivel de mutación bajo (3xLoD) y muestras nativas, con al menos 39/40 identificaciones de mutación correctas para todos los ensayos en varios lotes, plataformas y operarios, tanto para experimentos dentro de un mismo laboratorio como entre laboratorios. Las estimaciones de varianza demostradas (1 desviación estándar) con muestras C50 y 3xLoD se enumeran en Tabla 27 y Tabla 28.

Tabla 27. Estimaciones de varianza del ensayo

Ensayo	%CV para Δ Ct		%CV para el Ct mutante		%CV para el Ct de control		
	3x LoD	C50	3x LoD	C50	3x LoD	C50	WT
12ALA	13,14	8,32	1,87	2,02	0,97	1,12	1,12
12ARG	10,79	8,04	1,59	1,96	1,24	1,51	1,15
12ASP	12,86	5,87	1,11	1,00	0,90	0,90	1,04
12CYS	17,61	10,83	1,86	2,02	1,54	1,22	1,15
12SER	13,97	10,43	1,71	2,11	0,94	1,19	1,15
12VAL	9,6	15,47	1,52	1,65	1,11	3,74	1,26
13ASP	13,73	9,35	1,91	2,08	1,11	1,41	1,19

Tabla 28. Estimaciones de precisión de la repetibilidad

Ensayo	%CV para ΔCt		%CV para el Ct mutante		%CV para el Ct de control		
	3x LoD	C50	3x LoD	C50	3x LoD	C50	WT
12ALA	10,71	7,51	1,69	1,76	0,77	0,90	0,79
12ARG	9,83	8,04	1,21	1,76	0,84	1,33	0,90
12ASP	10,16	4,08	0,93	0,89	0,80	0,76	0,76
12CYS	13,15	8,80	1,31	1,76	1,40	1,01	0,76
12SER	6,76	6,18	1,10	1,48	0,80	0,90	0,90
12VAL	9,21	15,32	1,40	1,42	0,91	3,49	0,94
13ASP	8,67	7,01	1,30	1,65	0,91	1,19	0,97

La proporción estimada de muestras 3xLoD con resultado de mutación y de muestras nativas se notificó de forma global y para cada uno de los sitios. Para todos los ensayos y combinaciones de muestras, al menos 79 de las 80 réplicas proporcionaron el resultado de mutación correcto. La proporción global de resultados correctos fue del 99,6 % (1115/1120); el 99,6 % (558/560) para muestras positivas para mutación (3xLoD) y el 99,5 % (557/560) para muestras sin mutación detectada (nativas) (Tabla 29).

Tabla 29. Total de identificaciones correctas

Mutación	Identificaciones correctas	
	Muestras 3 x LoD	Muestras nativas (bajo)
12ALA	79/80	80/80
12ARG	80/80	79/80
12ASP	80/80	80/80
12CYS	79/80	80/80
12SER	80/80	79/80
12VAL	80/80	79/80
13ASP	80/80	80/80

CPNM

Se evaluó la precisión de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit intralaboratorio (repetibilidad). Se notifican tanto la exactitud de los resultados de mutación como la precisión de los valores de ΔC_T (la diferencia en los valores de C_T entre una reacción de mutación y la reacción de control).

En total, se prepararon 15 miembros del panel. Uno para cada una de las 7 mutaciones detectadas por el KRAS kit (en LoD y 2x LoD) y un miembro del panel de tipo nativo (WT). Los miembros del panel mutante estaban representados por una estirpe celular FFPE o una

muestra clínica, según la disponibilidad. Todas las muestras se normalizaron a un Ct de control de 27 y las muestras mutantes se diluyeron en ADN de tipo nativo para generar suficiente material para las muestras a niveles de mutación de 1x LoD y 2x LoD.

La proporción de identificaciones correctas se presenta en Tabla 30 para cada panel de prueba y los valores de precisión cuantitativa se presentan en Tabla 31.

Tabla 30. Proporción de resultados de mutación correctos

Variables de agrupamiento		Proporción		Límite de confianza del 95 % bilateral	
Nivel de la muestra	Ensayo	Fracción	Porcentaje (%)	Límite inferior (%)	Límite superior (%)
2 × LoD	12ALA	28/28	100,00	87,66	100,00
	12ARG*	28/28	100,00	87,66	100,00
	12ASP	28/28	100,00	87,66	100,00
	12CYS	28/28	100,00	87,66	100,00
	12SER*	28/28	100,00	87,66	100,00
	12VAL	28/28	100,00	87,66	100,00
	13ASP*	28/28	100,00	87,66	100,00
LoD	12ALA	39/40	97,50	86,84	99,94
	12ARG	40/40	100,00	91,19	100,00
	12ASP	40/40	100,00	91,19	100,00
	12CYS	40/40	100,00	91,19	100,00
	12SER*	40/40	100,00	91,19	100,00
	12VAL	40/40	100,00	91,19	100,00
	13ASP*	38/40	95,00	83,08	99,39

Variables de agrupamiento		Proporción		Límite de confianza del 95 % bilateral	
Nivel de la muestra	Ensayo	Fracción	Porcentaje (%)	Límite inferior (%)	Límite superior (%)
WT	Todas	28/28	100,00	87,66	100,00

*Representado por estirpe celular de FFPE

Tabla 31. Componentes de varianza en términos de DE y %CV: repetibilidad

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre Día*	Entre N.º de serie	Entre Rqg*	Entre Lote del kit*	Entre Usuario*	Residual*	Total
Δ Ct	2 × LoD	12ALA	28	5,54	[0,0000, 0,00 %]	[0,1221, 2,20 %]	[0,0443, 0,80 %]	[0,0385, 0,70 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1335, 2,41 %]	[0,1843, 3,33 %]
		12ARG	28	4,80	[0,0000, 0,00 %]	[0,1891, 3,94 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,3244, 6,76 %]	[0,3737, 7,79 %]
		12ASP	28	4,72	[0,0860, 1,82 %]	[0,1446, 3,06 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1463, 3,10 %]	[0,1374, 2,91 %]	[0,1751, 3,71 %]	[0,2797, 5,93 %]
		12CYS	28	5,66	[0,0563, 0,99 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0995, 1,76 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0390, 0,69 %]	[0,2306, 4,08 %]	[0,2498, 4,41 %]
		12SER	28	5,36	[0,1429, 2,67 %]	[0,0274, 0,51 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0647, 1,21 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1753, 3,27 %]	[0,2129, 3,97 %]
		12VAL	28	4,26	[0,0000, 0,00 %]	[0,1016, 2,39 %]	[0,0593, 1,39 %]	[0,1128, 2,65 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2095, 4,92 %]	[0,2457, 5,77 %]
		13ASP	28	5,23	[0,0000, 0,00 %]	[0,2892, 5,53 %]	[0,0157, 0,30 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2171, 4,15 %]	[0,3575, 6,83 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre Día*	Entre N.º de serie	Entre Rgt*	Entre Lote del kit*	Entre Usuario*	Residual*	Total
	LoD	12ALA	40	6,36	[0,0000, 0,00 %]	[0,1584, 2,49 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2346, 3,69 %]	[0,2819, 4,43 %]
		12ARG	40	5,45	[0,0036, 0,07 %]	[0,1639, 3,01 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0797, 1,46 %]	[0,1674, 3,07 %]	[0,2397, 4,40 %]
		12ASP	40	4,73	[0,0000, 0,00 %]	[0,2485, 5,25 %]	[0,1087, 2,30 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0816, 1,72 %]	[0,1041, 2,20 %]	[0,2837, 6,00 %]
		12CYS	40	6,62	[0,1688, 2,55 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2056, 3,11 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2909, 4,40 %]	[0,3652, 5,52 %]
		12SER	40	6,37	[0,1006, 1,58 %]	[0,3153, 4,95 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0340, 0,53 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2253, 3,54 %]	[0,3854, 6,05 %]
		12VAL	40	5,13	[0,2874, 5,60 %]	[0,0976, 1,90 %]	[0,0227, 0,44 %]	[0,0874, 1,71 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1629, 3,18 %]	[0,2965, 5,78 %]
		13ASP	38	6,26	[0,3433, 5,48 %]	[0,1227, 1,96 %]	[0,0778, 1,24 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,3459, 5,52 %]	[0,4738, 7,57 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre Día*	Entre N.º de serie	Entre Rgq*	Entre Lote del kit*	Entre Usuario*	Residual*	Total
Ct del canal verde	2 × LoD	12ALA	28	32,09	[0,0000, 0,00 %]	[0,1314, 0,41 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0675, 0,21 %]	[0,1073, 0,33 %]	[0,1158, 0,36 %]	[0,1957, 0,61 %]
		12ARG	28	31,50	[0,0000, 0,00 %]	[0,2598, 0,82 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,3324, 1,06 %]	[0,4189, 1,33 %]
		12ASP	28	31,30	[0,0000, 0,00 %]	[0,1891, 0,60 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0920, 0,29 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1800, 0,58 %]	[0,2667, 0,85 %]
		12CYS	28	32,07	[0,0000, 0,00 %]	[0,2523, 0,79 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1606, 0,50 %]	[0,2011, 0,63 %]	[0,1512, 0,47 %]	[0,3388, 1,06 %]
		12SER	28	32,06	[0,0000, 0,00 %]	[0,2049, 0,64 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1250, 0,39 %]	[0,1177, 0,37 %]	[0,1263, 0,39 %]	[0,2648, 0,83 %]
		12VAL	28	30,65	[0,0000, 0,00 %]	[0,1772, 0,58 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1198, 0,39 %]	[0,1063, 0,35 %]	[0,1656, 0,54 %]	[0,2639, 0,86 %]
	LoD	13ASP	28	31,98	[0,0000, 0,00 %]	[0,3773, 1,18 %]	[0,0497, 0,16 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1813, 0,57 %]	[0,4138, 1,29 %]
		12ALA	40	32,86	[0,0000, 0,00 %]	[0,2332, 0,71 %]	[0,0516, 0,16 %]	[0,0840, 0,26 %]	[0,1319, 0,40 %]	[0,1780, 0,54 %]	[0,3144, 0,96 %]
		12ARG	40	31,90	[0,0000, 0,00 %]	[0,2186, 0,69 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2289, 0,72 %]	[0,1519, 0,48 %]	[0,3106, 0,97 %]
		12ASP	40	31,02	[0,0000, 0,00 %]	[0,1762, 0,57 %]	[0,1093, 0,35 %]	[0,1296, 0,42 %]	[0,2492, 0,80 %]	[0,1005, 0,32 %]	[0,2908, 0,94 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre Día*	Entre N.º de serie	Entre Rgq*	Entre Lote del kit*	Entre Usuario*	Residual*	Total
		12CYS	40	33,14	[0,1216, 0,37 %]	[0,0493; 0,15 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,3468, 1,05 %]	[0,0501, 0,15 %]	[0,3155, 0,95 %]	[0,4216, 1,27 %]
		12SER	40	33,08	[0,0832, 25 %]	[0,2591, 0,78 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2424, 0,73 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2258, 0,68 %]	[0,3864, 1,17 %]
		12VAL	40	31,62	[0,2858, 0,90 %]	[0,0951, 0,30 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2244, 0,71 %]	[0,0344, 0,11 %]	[0,1763, 0,56 %]	[0,3432, 1,09 %]
		13ASP	38	33,09	[0,3237, 0,98 %]	[0,1009, 0,31 %]	[0,1409, 0,43 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2785, 0,84 %]	[0,4133, 1,27 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre Día*	Entre N.º de serie	Entre Rgt*	Entre Lote del kit*	Entre Usuario*	Residual*	Total
Yellow Ct	2 × LoD	12ALA	28	33,20	[0,0000, 0,00 %]	[0,0515, 0,16 %]	[0,0330, 0,10 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0607, 0,18 %]	[0,2117, 0,64 %]	[0,2235, 0,67 %]
		12ARG	28	33,05	[0,1397, 0,42 %]	[0,1321, 0,40 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2393, 0,72 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,3792, 1,15 %]	[0,4559, 1,38 %]
		12ASP	28	33,00	[0,0597, 0,18 %]	[0,2131, 0,65 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1313, 0,40 %]	[0,1954, 0,59 %]	[0,3059, 0,93 %]
		12CYS	28	33,19	[0,0646, 0,19 %]	[0,0971, 0,29 %]	[0,0233, 0,07 %]	[0,0679, 0,20 %]	[0,0863, 0,26 %]	[0,1943, 0,59 %]	[0,2378, 0,72 %]
		12SER	28	32,85	[0,0525, 0,16 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0337, 0,10 %]	[0,0937, 0,29 %]	[0,1320, 0,40 %]	[0,1588, 0,48 %]
		12VAL	28	33,11	[0,0000, 0,00 %]	[0,1026, 0,31 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1469, 0,44 %]	[0,1469, 0,44 %]	[0,2912, 0,88 %]	[0,3458, 1,04 %]
		13ASP	28	33,03	[0,0000, 0,00 %]	[0,1928, 0,58 %]	[0,1015, 0,31 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1450, 0,44 %]	[0,2493, 0,75 %]
		12ALA	40	33,37	[0,0000, 0,00 %]	[0,2010, 0,60 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1942, 0,58 %]	[0,2177, 0,65 %]	[0,3257, 0,98 %]
		12ARG	40	33,14	[0,0000, 0,00 %]	[0,2168, 0,65 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,3061, 0,92 %]	[0,1637, 0,49 %]	[0,1748, 0,53 %]	[0,3717, 1,120 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre Día*	Entre N.º de serie	Entre Rgt*	Entre Lote del kit*	Entre Usuario*	Residual*	Total
Yellow Ct	WT	12ASP	40	32,98	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2599, 0,79 %] [0,2599, 0,79 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,0000, 0,00 %]	[0,1735, 0,53 %] [0,1735, 0,53 %]	[0,2228, 0,68 %] [0,2228, 0,68 %]	[0,3618, 1,10 %] [0,3618, 1,10 %]
		12CYS	40	33,31	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2028, 0,61 %] [0,2028, 0,61 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,1209, 0,36 %] [0,1209, 0,36 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2132, 0,64 %] [0,2132, 0,64 %]	[0,3050, 0,92 %] [0,3050, 0,92 %]
		12SER	40	33,08	[0,1254, 0,38 %] [0,1254, 0,38 %]	[0,2847, 0,86 %] [0,2847, 0,86 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,1505, 0,46 %] [0,1505, 0,46 %]	[0,3263, 0,99 %] [0,3263, 0,99 %]
		12VAL	40	33,29	[0,3133, 0,94 %] [0,3133, 0,94 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2621, 0,79 %] [0,2621, 0,79 %]	[0,3574, 1,07 %] [0,3574, 1,07 %]
		13ASP	40	33,13	[0,1101, 0,33 %] [0,1101, 0,33 %]	[0,1326, 0,40 %] [0,1326, 0,40 %]	[0,1666, 0,50 %] [0,1666, 0,50 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,1925, 0,58 %] [0,1925, 0,58 %]	[0,2804, 0,85 %] [0,2804, 0,85 %]
		12ALA	28	33,41	[0,1443, 0,43 %] [0,1443, 0,43 %]	[0,1997, 0,60 %] [0,1997, 0,60 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2269, 0,68 %] [0,2269, 0,68 %]	[0,3248, 0,97 %] [0,3248, 0,97 %]
		12ARG	28	33,30	[0,0875, 0,26 %] [0,0875, 0,26 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,4098, 1,23 %] [0,4098, 1,23 %]	[0,0904, 0,27 %] [0,0904, 0,27 %]	[0,2368, 0,71 %] [0,2368, 0,71 %]	[0,3983, 1,20 %] [0,3983, 1,20 %]
		12ASP	28	33,12	[0,1591, 0,48 %] [0,1591, 0,48 %]	[0,1748, 0,53 %] [0,1748, 0,53 %]	[0,0477, 0,14 %] [0,0477, 0,14 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2131, 0,64 %] [0,2131, 0,64 %]	[0,3075, 0,93 %] [0,3075, 0,93 %]
		12CYS	28	33,42	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2009, 0,60 %] [0,2009, 0,60 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,1444, 0,43 %] [0,1444, 0,43 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2121, 0,63 %] [0,2121, 0,63 %]	[0,3077, 0,92 %] [0,3077, 0,92 %]
		12SER	28	33,22	[0,2485, 0,75 %] [0,2485, 0,75 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0633, 0,19 %] [0,0633, 0,19 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,1497, 0,45 %] [0,1497, 0,45 %]	[0,2517, 0,76 %] [0,2517, 0,76 %]
		12VAL	28	33,35	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2591, 0,78 %] [0,2591, 0,78 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,1429, 0,43 %] [0,1429, 0,43 %]	[0,0000, 0,00 %] [0,0000, 0,00 %]	[0,2721, 0,82 %] [0,2721, 0,82 %]	[0,3863, 1,16 %] [0,3863, 1,16 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre Día*	Entre N.º de serie	Entre Rgq*	Entre Lote del kit*	Entre Usuario*	Residual*	Total
		13ASP	28	33,45	[0,0000, 0,00 %]	[0,1194, 0,36 %]	[0,0526, 0,16 %]	[0,0341, 0,10 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1651, 0,49 %]	[0,2078, 0,62 %]

* DE, % CV

Se evaluó la precisión del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit entre laboratorios (reproducibilidad). Se utilizaron tres laboratorios diferentes (centros de ensayo). Se utilizó el mismo panel de pruebas que para el estudio de repetibilidad. En cada centro, las condiciones de laboratorio variaron según el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, el operador, el lote de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit y las series por día para obtener un total de 88 series por centro durante 22 días no consecutivos.

La proporción de identificaciones de mutación correctas se indica en la Tabla 32. Los valores de precisión cuantitativa se presentan en Tabla 33. La reproducibilidad total de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se muestra en la columna #Total (DE, %CV) de la Tabla 33.

Tabla 32. Proporción de identificaciones de mutación correctas en todos los centros.

Variables de agrupamiento		Proporción		Límite de confianza del 95 % bilateral	
Nivel de la muestra	Ensayo	Fracción	Porcentaje (%)	Límite inferior (%)	Límite superior (%)
2 × LoD	12ALA	84/84	100,00	95,70	100,00
	12ARG*	84/84	100,00	95,70	100,00
	12ASP	84/84	100,00	95,70	100,00
	12CYS	84/84	100,00	95,70	100,00
	12SER*	84/84	100,00	95,70	100,00
	12VAL	84/84	100,00	95,70	100,00
	13ASP*	84/84	100,00	95,70	100,00
LoD	12ALA	118/120	98,33	94,11	99,80
	12ARG	120/120	100,00	96,97	100,00
	12ASP	120/120	100,00	96,97	100,00
	12CYS	119/120	99,17	95,44	99,88
	12SER*	120/120	100,00	96,97	100,00
	12VAL	120/120	100,00	96,97	100,00
	13ASP*	118/120	98,33	94,11	99,80
WT	Todas	82/84	97,62	91,66	99,71

* Representada por una línea celular FFPE.

Tabla 33. Componentes de varianza en términos de DE y %CV: reproducibilidad

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre los centros*	Entre el día en el centro*	Entre el n.º de serie en el centro*	Entre Rgq dentro del centro*	Entre Late del kit en el centro*	Entre Usuario en el centro*	Residual*	Total
Δ Ct	2 × LoD	12ALA	84	5,48	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1669, 3,05 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1287, 2,35 %]	[0,1679, 3,07 %]	[0,2640, 4,82 %]
		12ARG	84	4,81	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1172, 2,43 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2729, 5,67 %]	[0,2967, 6,16 %]
		12ASP	84	4,57	[0,0000, 0,00 %]	[0,0943, 2,06 %]	[0,1457, 3,19 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0600, 1,31 %]	[0,1718, 3,76 %]	[0,1565, 3,43 %]	[0,2854, 6,25 %]
		12CYS	84	5,61	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2040, 3,67 %]	[0,0264, 0,47 %]	[0,0698, 1,24 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1671, 2,98 %]	[0,2728, 4,87 %]
		12SER	84	5,34	[0,0000, 0,00 %]	[0,1362, 2,55 %]	[0,1669, 3,13 %]	[0,1527, 2,86 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2020, 3,79 %]	[0,2382, 4,46 %]	[0,3902, 7,31 %]
		12VAL	84	4,13	[0,0874, 2,11 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1677, 4,06 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0869, 2,10 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2711, 6,56 %]	[0,3359, 8,12 %]
		13ASP	84	5,22	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2161, 4,14 %]	[0,2712, 5,20 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1930, 3,70 %]	[0,2275, 4,36 %]	[0,4279, 8,20 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre los centros*	Entre el día en el centro*	Entre el n.º de serie en el centro*	Entre Rgq dentro del centro*	Entre Late del kit en el centro*	Entre Usuario en el centro*	Residual*	Total
LoD	12ALA	119	6,33	0,0000, 0,00 %	0,0410, 0,65 %	0,1207, 1,91 %	0,0000, 0,00 %	0,0000, 0,00 %	0,0247, 0,39 %	0,2640, 4,17 %	0,2936, 4,64 %	
	12ARG	120	5,42	0,0000, 0,00 %	0,0000, 0,00 %	0,1797, 3,31 %	0,0000, 0,00 %	0,0000, 0,00 %	0,0000, 0,00 %	0,1872, 3,45 %	0,2590, 4,78 %	
	12ASP	120	4,66	0,1183, 2,54 %	0,0646, 1,38 %	0,2121, 4,55 %	0,0261, 0,56 %	0,0217, 0,46 %	0,0440, 0,94 %	0,1455, 3,12 %	0,2862, 6,14 %	
	12CYS	120	6,54	0,0000, 0,00 %	0,0132, 0,20 %	0,1775, 2,72 %	0,0000, 0,00 %	0,1621, 2,48 %	0,1708, 2,61 %	0,4202, 6,43 %	0,4981, 7,62 %	
	12SER	120	6,28	0,0000, 0,00 %	0,0824, 1,31 %	0,2271, 3,62 %	0,0775, 1,24 %	0,0000, 0,00 %	0,2383, 3,80 %	0,3164, 5,04 %	0,4570, 7,28 %	
	12VAL	120	5,05	0,0315, 0,62 %	0,1648, 3,26 %	0,0955, 1,89 %	0,0703, 1,39 %	0,0320, 0,63 %	0,0795, 1,57 %	0,2120, 4,20 %	0,2965, 5,87 %	
	13ASP	118	6,17	0,0000, 0,00 %	0,1673, 2,71 %	0,1987, 3,22 %	0,2332, 3,78 %	0,0000, 0,00 %	0,0843, 1,37 %	0,3075, 4,99 %	0,4488, 7,28 %	

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre los centros*	Entre el día en el centro*	Entre el n.º de serie en el centro*	Entre Rgq dentro del centro*	Entre Late del kit en el centro*	Entre Usuario en el centro*	Residual*	Total
Ci del canal verde	2 × LoD	12ALA	84	32,13	[0,1578, 0,49 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2509, 0,78 %]	[0,0745, 0,23 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1249, 0,39 %]	[0,1362, 0,42 %]	[0,3390, 1,06 %]
		12ARG	84	31,61	[0,0882, 0,28 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2430, 0,77 %]	[0,1339, 0,42 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2604, 0,82 %]	[0,3828, 1,21 %]
		12ASP	84	31,24	[0,1655, 0,53 %]	[0,0391, 0,13 %]	[0,2178, 0,70 %]	[0,0600, 0,19 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2052, 0,66 %]	[0,1426, 0,46 %]	[0,3542, 1,13 %]
		12CVS	84	32,15	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2836, 0,88 %]	[0,0852, 0,26 %]	[0,0940, 0,29 %]	[0,1658, 0,52 %]	[0,1318, 0,41 %]	[0,3636, 1,13 %]
		12SER	84	32,14	[0,1457, 0,45 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2659, 0,83 %]	[0,1807, 0,56 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2715, 0,84 %]	[0,1783, 0,55 %]	[0,4554, 1,42 %]
		12VAL	84	30,69	[0,0646, 0,21 %]	[0,0480, 0,16 %]	[0,2124, 0,69 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1031, 0,34 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2000, 0,65 %]	[0,3143, 1,02 %]
		13ASP	84	32,12	[0,2111, 0,66 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,3218, 1,00 %]	[0,2966, 0,92 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1743, 0,54 %]	[0,1980, 0,62 %]	[0,5184, 1,61 %]
	LoD	12ALA	119	32,93	[0,0000, 0,00 %]	[0,1524, 0,46 %]	[0,1821, 0,55 %]	[0,1048, 0,32 %]	[0,0757, 0,23 %]	[0,1007, 0,31 %]	[0,2526, 0,77 %]	[0,3721, 1,13 %]
		12ARG	120	31,98	[0,0000, 0,00 %]	[0,0743, 0,23 %]	[0,1936, 0,61 %]	[0,1262, 0,39 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1332, 0,42 %]	[0,1619, 0,51 %]	[0,3096, 0,97 %]
		12ASP	120	31,06	[0,1880, 0,61 %]	[0,1184, 0,38 %]	[0,1681, 0,54 %]	[0,1033, 0,33 %]	[0,1171, 0,38 %]	[0,1481, 0,48 %]	[0,1333, 0,43 %]	[0,3511, 1,13 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre los centros*	Entre el día en el centro*	Entre el n.º de serie en el centro*	Entre Rgq dentro del centro*	Entre Late del kit en el centro*	Entre Usuario en el centro*	Residual*	Total
		12CYS	120	33,19	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2513, 0,76 %]	[0,0776, 0,23 %]	[0,2128, 0,64 %]	[0,1427, 0,43 %]	[0,2712, 0,82 %]	[0,4401, 1,33 %]
		12SER	120	33,13	[0,2194, 0,66 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2433, 0,73 %]	[0,1263, 0,38 %]	[0,1470, 0,44 %]	[0,1973, 0,60 %]	[0,2052, 0,62 %]	[0,4437, 1,34 %]
		12VAL	120	31,65	[0,0000, 0,00 %]	[0,1254, 0,40 %]	[0,1645, 0,52 %]	[0,1307, 0,41 %]	[0,1271, 0,40 %]	[0,0976, 0,31 %]	[0,1792, 0,57 %]	[0,3159, 1,00 %]
		13ASP	118	33,08	[0,0000, 0,00 %]	[0,1789, 0,54 %]	[0,1661, 0,50 %]	[0,3569, 1,08 %]	[0,0649, 0,20 %]	[0,1565, 0,47 %]	[0,2588, 0,78 %]	[0,4894, 1,48 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre los centros*	Entre el día en el centro*	Entre el n.º de serie en el centro*	Entre Rgq dentro del centro*	Entre Late del kit en el centro*	Entre Usuario en el centro*	Residual*	Total
Yellow Ct	2 × LoD	12ALA	84	33,25	[0,0706, 0,21 %]	[0,0399, 0,12 %]	[0,1314, 0,40 %]	[0,1303, 0,39 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1124, 0,34 %]	[0,1913, 0,58 %]	[0,2883, 0,87 %]
		12ARG	84	33,07	[0,0000, 0,00 %]	[0,1406, 0,43 %]	[0,1353, 0,41 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2024, 0,61 %]	[0,1262, 0,38 %]	[0,2831, 0,86 %]	[0,4016, 1,21 %]
		12ASP	84	32,98	[0,0000, 0,00 %]	[0,0480, 0,15 %]	[0,1706, 0,52 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0797, 0,24 %]	[0,1795, 0,54 %]	[0,2616, 0,79 %]
		12CYS	84	33,20	[0,0000, 0,00 %]	[0,0976, 0,29 %]	[0,1781, 0,54 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1454, 0,44 %]	[0,1723, 0,52 %]	[0,2939, 0,89 %]
		12SER	84	32,91	[0,0000, 0,00 %]	[0,1101, 0,33 %]	[0,0549, 0,17 %]	[0,0669, 0,20 %]	[0,0677, 0,21 %]	[0,1186, 0,36 %]	[0,2274, 0,69 %]	[0,2916, 0,89 %]
	LoD	12VAL	84	33,17	[0,0688, 0,21 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1896, 0,57 %]	[0,0937, 0,28 %]	[0,1140, 0,34 %]	[0,1311, 0,40 %]	[0,2605, 0,79 %]	[0,3768, 1,14 %]
		13ASP	84	33,10	[0,0000, 0,00 %]	[0,0482, 0,15 %]	[0,2035, 0,61 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0466, 0,14 %]	[0,1460, 0,44 %]	[0,1688, 0,51 %]	[0,3019, 0,91 %]
		12ALA	119	33,33	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2108, 0,63 %]	[0,0820, 0,25 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1443, 0,43 %]	[0,2253, 0,68 %]	[0,3411, 1,02 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre los centros*	Entre el día en el centro*	Entre el n.º de serie en el centro*	Entre Rgq dentro del centro*	Entre Late del kit en el centro*	Entre Usuario en el centro*	Residual*	Total
		12ARG	120	33,15	[0,1092, 0,33 %]	[0,0537, 0,16 %]	[0,1605, 0,48 %]	[0,0507, 0,15 %]	[0,2157, 0,65 %]	[0,1276, 0,39 %]	[0,2180, 0,66 %]	[0,3749, 1,13 %]
		12ASP	120	32,96	[0,0000, 0,00 %]	[0,0832, 0,25 %]	[0,2022, 0,61 %]	[0,0864, 0,26 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1117, 0,34 %]	[0,2223, 0,67 %]	[0,3343, 1,01 %]
		12CVS	120	33,26	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2232, 0,67 %]	[0,1691, 0,51 %]	[0,0789, 0,24 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2097, 0,63 %]	[0,3516, 1,06 %]
		12SER	120	33,01	[0,1573, 0,48 %]	[0,0716, 0,22 %]	[0,2134, 0,65 %]	[0,0951, 0,29 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0784, 0,24 %]	[0,1689, 0,51 %]	[0,3263, 0,99 %]
		12VAL	120	33,25	[0,1519, 0,46 %]	[0,1960, 0,59 %]	[0,1272, 0,38 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1298, 0,39 %]	[0,0553, 0,17 %]	[0,2162, 0,65 %]	[0,3487, 1,05 %]
		13ASP	118	33,16	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1768, 0,53 %]	[0,0998, 0,30 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1973, 0,59 %]	[0,2802, 0,84 %]

Variable de análisis	Nivel de la muestra	Ensayo	N.º de observaciones	Media	Entre los centros*	Entre el día en el centro*	Entre el n.º de serie en el centro*	Entre Rgq dentro del centro*	Entre Late del kit en el centro*	Entre Usuario en el centro*	Residual*	Total
WT	12ALA		84	33,44	[0,1257, 0,38 %]	[0,0961, 0,29 %]	[0,1845, 0,55 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2083, 0,62 %]	[0,3104, 0,93 %]
	12ARG		84	33,37	[0,1191, 0,36 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1869, 0,56 %]	[0,1321, 0,40 %]	[0,2529, 0,76 %]	[0,1205, 0,36 %]	[0,2132, 0,64 %]	[0,4217, 1,26 %]
	12ASP		84	33,16	[0,0574, 0,17 %]	[0,0738, 0,22 %]	[0,2162, 0,65 %]	[0,0563, 0,17 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1844, 0,56 %]	[0,2997, 0,90 %]
	12CYS		84	33,42	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1964, 0,59 %]	[0,0720, 0,22 %]	[0,1311, 0,39 %]	[0,0262, 0,08 %]	[0,2258, 0,68 %]	[0,3287, 0,98 %]
	12SER		84	33,20	[0,0812, 0,24 %]	[0,1331, 0,40 %]	[0,1734, 0,52 %]	[0,0329, 0,10 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2009, 0,61 %]	[0,1923, 0,58 %]	[0,3535, 1,06 %]
	12VAL		84	33,41	[0,0000, 0,00 %]	[0,0695, 0,21 %]	[0,2046, 0,61 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,1708, 0,51 %]	[0,1437, 0,43 %]	[0,2339, 0,70 %]	[0,3799, 1,14 %]
	13ASP		84	33,46	[0,0000, 0,00 %]	[0,0613, 0,18 %]	[0,1802, 0,54 %]	[0,0744, 0,22 %]	[0,0073, 0,02 %]	[0,0969, 0,29 %]	[0,1790, 0,53 %]	[0,2816, 0,84 %]

* DE, %CV

Variabilidad en la manipulación de muestras

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la variabilidad en la manipulación de las muestras, específicamente la extracción de ADN, en el *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 secciones de líneas celulares FFPE en 3 centros, seguido de un análisis con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

CCR

Se cortaron 30 secciones secuenciales de 5 µm de cada una de las 10 muestras FFPE de CCR (3 de tipo natural y 1 por mutación). Las secciones se asignaron aleatoriamente a 1 de los 3 centros de análisis, de forma que cada centro recibió 10 secciones por muestra FFPE (100 secciones en total). De las 300 extracciones de ADN analizadas, 298 muestras fueron válidas. Hubo una concordancia del 99,33 % con respecto a las identificaciones de mutaciones de *KRAS* entre los 3 centros.

La comparación por centros de los valores medios de ΔC_t para las muestras mutadas y nativas mostró una concordancia muy elevada en los resultados. Los resultados demuestran la concordancia del procedimiento de extracción de ADN y del procesamiento de muestras junto con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

CPNM

En este estudio se utilizaron trece muestras clínicas de CPNM (3 × 12ASP, 3 × 12CYS, 4 × 12VAL y tres nativas) y cuatro muestras de líneas celulares FFPE (12ALA, 12ARG, 12SER y 13ASP). Las muestras representaban los distintos métodos de obtención: RES, FNA y CNB. Se utilizaron líneas celulares para representar mutaciones poco frecuentes cuando no se disponía de tejido clínico de CPNM.

A continuación, los 3 lotes de 20 secciones FFPE se distribuyeron de forma aleatoria en los 3 centros. En cada uno de los tres 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 las muestras en tres centros de prueba individuales con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, se identificó cada una de las 7 mutaciones y muestras nativas con la identificación de mutación correcta. La identificación general para cada una de las 7 mutaciones y muestras nativas fue del 100 %, lo que demuestra la coherencia entre centros para la extracción de ADN y la detección de mutaciones mediante el uso del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Se realizó un estudio adicional de manipulación de muestras con muestras clínicas FFPE de CPNM representativas de las mutaciones 12ALA, 12ARG, 12SER y 13ASP, ya que en el estudio anterior se utilizaron muestras de líneas celulares representativas de estas mutaciones. Este estudio adicional siguió el mismo diseño que el estudio anterior. Todas las preparaciones de muestras para las muestras con mutación 12ALA, 12ARG y 13ASP extraídas en los tres centros de análisis individuales proporcionaron una identificación de mutación correcta al analizarse con el KRAS kit. La proporción global de identificaciones correctas para estas muestras fue 100 %. Las preparaciones de muestras para la mutación 12SER proporcionaron una frecuencia de identificación de mutación correcta de 28/30 (porcentaje de identificación correcta igual al 93,33 %) en los tres centros de análisis individuales. Los resultados demuestran la coherencia del procedimiento de extracción de ADN y del flujo de trabajo de procesamiento de muestras utilizado para realizar el análisis con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Equivalencia de los métodos de obtención de muestras (solo CPNM)

El propósito de este estudio fue evaluar si la determinación de la mutación para las muestras de CPNM mediante el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se veía afectada por el método de

obtención de muestras. Los tres métodos de obtención de muestras evaluados en este estudio fueron RES, FNA y CNB.

Para este estudio, se obtuvieron muestras de CNB y FNA "correspondientes a cada paciente" a partir de muestras de tumores reseccionados quirúrgicamente para permitir la obtención del mismo tumor mediante los tres métodos de obtención. Se extrajo y analizó cada muestra con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Se extrajo y analizó cada muestra con el *KRAS* Control assay. Todas las muestras que arrojaron un resultado válido (169 resecciones, 169 CNB y 164 FNA) se analizaron con los 8 ensayos *KRAS*.

El análisis primario se basó en la mutación específica detectada en los tipos de adquisición. Se calcularon las medidas de concordancia porcentual general, concordancia porcentual positiva y concordancia porcentual negativa, junto con el límite de confianza bilateral exacto del 95 % para cada comparación por pares.

Tabla 34. Concordancia entre métodos de análisis de muestras

Comparación	Acuerdo	Frecuencias	Porcentaje (%)	Límite de confianza bilateral inferior (%)	Límites de confianza bilaterales superiores del 95 % (%)
CNB frente a FNA con CNB como referencia	Porcentaje de concordancia global	148/156	94,87	90,15	97,76
	Porcentaje de concordancia positiva	29/35	82,86	66,35	93,44
	Porcentaje de concordancia negativa	119/121	98,35	94,16	99,80
CNB frente a RES con CNB como referencia	Porcentaje de concordancia global	153/161	95,03	90,44	97,83
	Porcentaje de concordancia positiva	31/37	83,78	67,99	93,81
	Porcentaje de concordancia negativa	122/124	98,39	94,30	99,80

Comparación	Acuerdo	Frecuencias	Porcentaje (%)	Límite de confianza bilateral inferior (%)	Límites de confianza bilaterales superiores del 95 % (%)
FNA frente a CNB con FNA como referencia	Porcentaje de concordancia global	148/156	94,87	90,15	97,76
	Porcentaje de concordancia positiva	29/32	90,63	74,98	98,02
	Porcentaje de concordancia negativa	119/124	95,97	90,84	98,68
FNA frente a RES con FNA como referencia	Porcentaje de concordancia global	152/156	97,44	93,57	99,30
	Porcentaje de concordancia positiva	30/32	93,75	79,19	99,23
	Porcentaje de concordancia negativa	122/124	98,39	94,30	99,80
RES frente a CNB con RES como referencia	Porcentaje de concordancia global	153/161	95,03	90,44	97,83
	Porcentaje de concordancia positiva	31/34	91,18	76,32	98,14

Comparación	Acuerdo	Frecuencias	Porcentaje (%)	Límite de confianza bilateral inferior (%)	Límites de confianza bilaterales superiores del 95 % (%)
	Porcentaje de concordancia negativa	122/127	96,06	91,05	98,71
RES frente a FNA con RES como referencia	Porcentaje de concordancia global	152/156	97,44	93,57	99,30
	Porcentaje de concordancia positiva	30/32	93,75	79,19	99,23
	Porcentaje de concordancia negativa	122/124	98,39	94,30	99,80

Además, se realizaron análisis de regresión de Passing-Bablok y de Deming para comparar los valores de Ct y Δ Ct entre diferentes métodos de obtención de muestras. El análisis de regresión demostró que no hay pruebas que sugieran la existencia de una diferencia constante o proporcional entre los tipos de muestra RES, CNB y FNA en cuanto a Ct o Δ Ct. Se realizó también un análisis de regresión lineal para investigar el efecto tanto del porcentaje de tejido necrótico como tumoral en los valores Δ Ct pertinentes. La pendiente de la recta de regresión para el porcentaje de tejido necrótico y tumoral frente a Δ Ct indica que no hay pruebas que sugieran que exista ninguna diferencia significativa en los valores de Δ Ct con el aumento de los valores del porcentaje de tejido necrótico o tumoral.

El *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se ha diseñado para detectar específicamente 7 mutaciones de *KRAS* en los codones 12 y 13 del gen *KRAS*. No se ha diseñado específicamente para detectar la secuencia nativa en estos codones. Los resultados de esta prueba se generan como “[mutation name] Detected” [(nombre de la mutación) detectada] y “No Mutation Detected” (mutación no detectada).

Estudio clínico que respalda el uso con Erbitux (cetuximab)

Se llevó a cabo un estudio de rendimiento clínico para generar datos que respalden la utilidad clínica del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit como herramienta de diagnóstico que permite la selección de pacientes para el tratamiento con Erbitux (cetuximab). La seguridad y la eficacia de Erbitux (cetuximab) se han demostrado en el estudio CA225025. CA225025 fue un ensayo clínico multicéntrico, abierto y aleatorizado realizado en 572 pacientes con CCR metastásico (CCRM) recurrente, previamente tratado y con expresión de EGFR. Los pacientes fueron aleatorizados (1:1) para recibir Erbitux (cetuximab) más el mejor tratamiento de apoyo (best supportive care, BSC) o BSC solo. Erbitux (cetuximab) se administró en una dosis inicial de 400 mg/m², seguida de 250 mg/m² semanales hasta la progresión de la enfermedad o una toxicidad inaceptable.

De los 572 pacientes aleatorizados, la mediana de edad era de 63 años; el 64 % eran hombres, el 89 % eran caucásicos y el 77 % presentaba un estado funcional ECOG inicial de 0-1. Los datos demográficos y las características iniciales eran similares entre los brazos del estudio. Todos los pacientes debían haber recibido tratamiento previo y haber progresado con este, por ejemplo, un régimen con irinotecán y un régimen con oxaliplatino.

Se disponía del estado de la mutación del *KRAS* en 453/572 (79 %) de los pacientes: 245 (54 %) pacientes presentaban tumores que dieron positivo en la mutación en el *KRAS* y 208 (46 %) pacientes presentaban tumores que dieron negativo en el *KRAS*, según la evaluación realizada mediante el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

La medida de resultado principal del estudio fue la supervivencia global (SG). En la población sin mutación de *KRAS* (nativo), la mediana del tiempo de supervivencia (IC del 95 %) fue de 8,6 (7,0, 10,3) meses en el grupo de Erbitux (cetuximab) + BSC y de 5,0 (4,3, 5,7) meses en el grupo de BSC. El cociente de riesgo de SG de Erbitux (cetuximab)+ BSC sobre BSC fue 0,63. El intervalo de confianza (IC) del 95 % fue (0,47, 0,84).

Para la población con mutación de *KRAS*, la mediana del tiempo de supervivencia fue de 4,8 (3,9, 5,6) meses en el grupo de Erbitux (cetuximab) + BSC y de 4,6 (3,6, 4,9) meses en el grupo de BSC. El cociente de riesgo fue 0,91 con un IC del 95% (0,67, 1,24). Los resultados se presentan en Tabla 35 y Figura 23.

Tabla 35. Supervivencia global en cáncer colorrectal metastásico con expresión de EGFR previamente tratado (todos aleatorizados y estado de *KRAS*)

	Todos aleatorizados		Sin mutación de <i>KRAS</i> nativo		Con mutación de <i>KRAS</i>	
	Erbitux+BSC N=287	BSC N=285	Erbitux+BSC N=117	BSC N=128	Erbitux+BSC N=108	BSC N=100
Mediana (meses) (IC del 95%)	6.1 (5,4; 6,7)	4,6 (4,2; 4,9)	8,6 (7,0; 10,3)	5,0 (4,3; 5,7)	4,8 (3,9; 5,6)	4,6 (3,6; 4,9)
Cociente de riesgo (IC del 95%)	0,77 (0,64; 0,92)		0,63 (0,47; 0,84)		0,91 (0,67; 1,24)	
*"p-value" (valor p).	0,0046		–		–	

* Según la prueba estratificada de rangos logarítmicos.

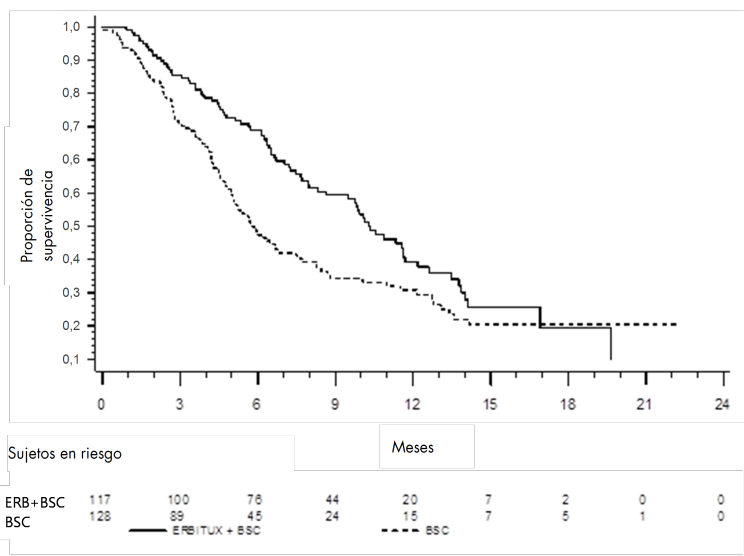


Figura 23. Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global en pacientes con cáncer colorrectal metastásico sin mutación de KRAS (nativo).

Las tasas de supervivencia global basadas en las estimaciones de Kaplan-Meier a los 6 y 12 meses fueron mayores para el grupo de Erbitux (cetuximab)+BSC que para el grupo de BSC en el subconjunto con KRAS nativo. Esta ventaja no se observó en el subconjunto con KRAS mutado.

Estudio clínico que apoya el uso con Vectibix (panitumumab)

Se hizo un estudio de rendimiento clínico para generar datos que respaldaran la utilidad clínica del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit como una herramienta de diagnóstico que ayude en la identificación de pacientes para el tratamiento con Vectibix (panitumumab). El objetivo del estudio era evaluar si el estado de la mutación de KRAS, determinado mediante el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, puede utilizarse para seleccionar a los pacientes con CCRm

que se beneficiarán del tratamiento con Vectibix (panitumumab). El ensayo clínico 20050203 fue un estudio multicéntrico, prospectivo, abierto y aleatorizado de fase 3 destinado a evaluar la eficacia del panitumumab en combinación con oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU) y leucovorina (FOLFOX) frente a FOLFOX solo en pacientes con CCRm recurrente no tratado previamente.

Las muestras tumorales almacenadas de los pacientes del estudio 20050203 se analizaron con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit para identificar 2 subgrupos: positivos en la mutación de *KRAS* (*KRAS* mutante) y negativos en la mutación de *KRAS* (*KRAS* nativo), según se detectara al menos 1 o ninguna de las 7 mutaciones *KRAS* en los codones 12 y 13 del exón 2 del gen *KRAS*. En los análisis retrospectivos, los datos de eficacia del estudio 20050203 se estratificaron por subgrupo *KRAS*. El objetivo principal del análisis de *KRAS* era evaluar si la mejora global de la PFS de Vectibix (panitumumab) más FOLFOX frente a FOLFOX solo era significativamente mayor entre los sujetos con tumores *KRAS* nativo en comparación con los sujetos con tumores *KRAS* mutantes.

El criterio de valoración principal de eficacia preespecificado fue la supervivencia libre de progresión (PFS) en el grupo de pacientes (n = 656) con CCRm con *KRAS* nativo, evaluada mediante una revisión centralizada, enmascarada e independiente de las pruebas de imagen. Otros criterios de valoración clave de la eficacia incluyeron la SG y la TRO. Los resultados de eficacia en pacientes con CCRm con *KRAS* nativo se presentan en Tabla 36 y Figura 24.

Tabla 36. Resultados de eficacia en pacientes con CCRm con *KRAS* nativo

SSP					
	Población con <i>KRAS</i> nativo	Mediana (meses) (IC del 95%)	Cociente de riesgo (IC del 95%)	valor p	TSG (IC del 95%)
Panitumumab y FOLFOX	N=325	9,6 (9,2; 11,1)	0,80 (0,66; 0,97)	0,02	54 % (48 %, 59 %)

Tabla 36. Resultados de eficacia en pacientes con CCRm con KRAS nativo (continuación)

SSP					
	Población con KRAS nativo	Mediana (meses) (IC del 95%)	Cociente de riesgo (IC del 95%)	valor p	TSG (IC del 95%)
solo FOLFOX	N=331	8,0 (7,5; 9,3)			47 % (41 %, 52 %)

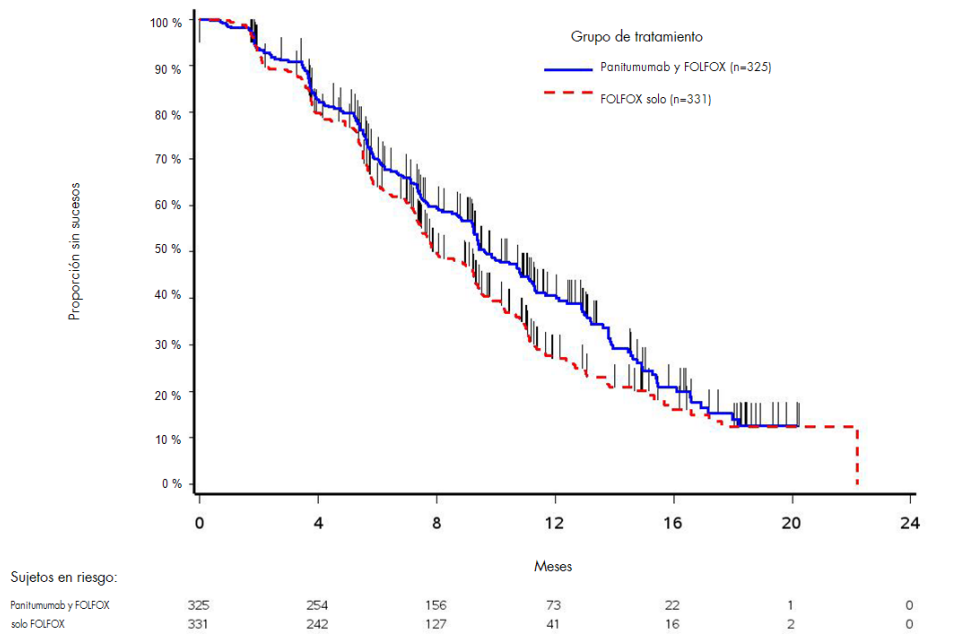


Figura 24. Gráfico de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de progresión (PFS) en pacientes con CCRm con KRAS nativo.

Entre los pacientes con tumores con mutación en KRAS, la mediana de la PFS fue de 7,3 meses (IC del 95 %: 6,3-8,0) en los 221 pacientes que recibieron Vectibix (panitumumab)

más FOLFOX, frente a la mediana de la SLP de 8,8 meses (IC del 95 %: 7,7; 9,4) en los 219 pacientes que recibieron FOLFOX en monoterapia (HR = 1,29; IC del 95 %: 1,04; 1,62). La mediana de la SG fue de 15,5 meses (IC del 95 %: 13,1-17,6) en los pacientes que recibieron Vectibix (panitumumab) más FOLFOX, frente a la mediana de la SG de 19,3 meses (IC del 95 %: 16,5; 21,8) en los pacientes que recibieron FOLFOX en monoterapia (HR = 1,24; IC del 95 %: 0,98; 1,57).

Un análisis exploratorio de la SG con información actualizada basada en eventos en el 82 % de los pacientes con CCRm con *KRAS* nativo estimó el efecto del tratamiento de Vectibix (panitumumab) más FOLFOX en comparación con FOLFOX solo. La mediana de la SG entre los 325 pacientes con CCRm con *KRAS* nativo que recibieron Vectibix (panitumumab) más FOLFOX fue de 23,8 meses (IC del 95 %: 20,0; 27,7) frente a los 19,4 meses (IC del 95 %: 17,4; 22,6) entre los 331 pacientes que recibieron FOLFOX solo (HR = 0,83, IC del 95 %: 0,70; 0,98). Se muestran los resultados en Figura 25.

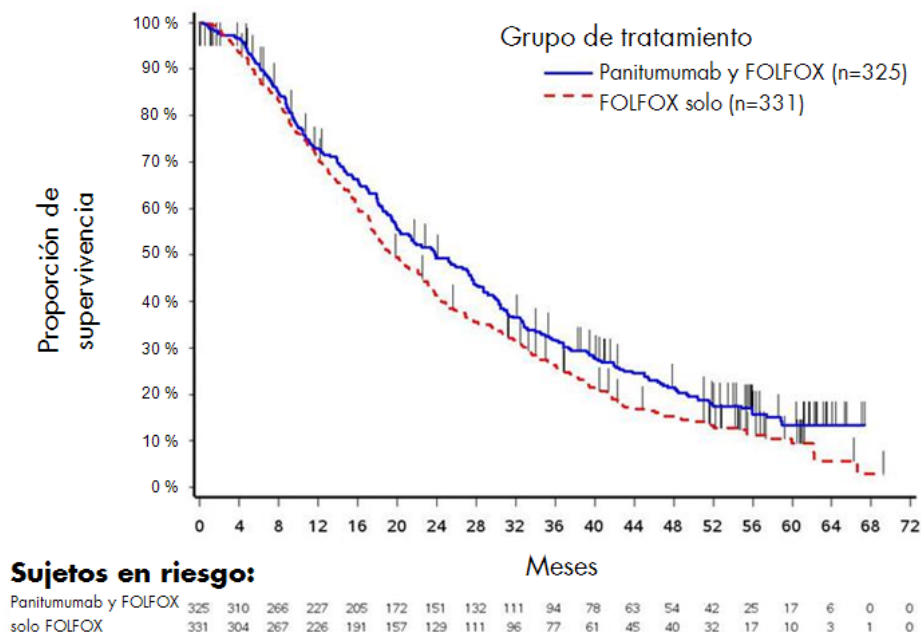


Figura 25. Gráfico de Kaplan-Meier de la supervivencia global (SG) en pacientes con CCRm con KRAS nativo.

Estudio clínico que respalda el uso de LUMYKRAS (sotorasib)

Se hizo un estudio de rendimiento clínico para demostrar la validez clínica del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit como herramienta diagnóstica para ayudar en la identificación de pacientes con CPNM que dieron positivo en la mutación de KRAS G12C para el tratamiento con LUMYKRAS (sotorasib). El objetivo del estudio fue evaluar si el estado de la mutación G12C, determinado mediante el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, puede utilizarse para seleccionar a pacientes con CPNM avanzado que se beneficiarán del tratamiento con LUMYKRAS (sotorasib). El ensayo clínico 20170543 fue un estudio abierto, multicéntrico, de

fase 1/2 diseñado para evaluar la eficacia y la seguridad de LUMYKRAS (sotorasib) en sujetos adultos con tumores sólidos avanzados que presentan la mutación de KRAS G12C.

Los datos del análisis principal de la parte de fase 2 de CPNM de este estudio se han utilizado para respaldar la validez clínica del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit como herramienta diagnóstica.

La inscripción se limitó a sujetos con CPNM con mutación de KRAS G12C según el resultado de un laboratorio local, que se confirmó mediante pruebas centrales con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

El criterio de valoración principal de la parte de la fase 2 de este estudio sobre el CPNM consistió en evaluar la tasa de respuesta objetiva (TRO) de los tumores, valorada según los Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST), versión 1.1, de LUMYKRAS (sotorasib) en monoterapia en pacientes con tumores avanzados con mutación de KRAS G12C.

De un total de 126 sujetos con CPNM, se incluyeron 124 sujetos en el conjunto de análisis completo. Se excluyeron dos (2) sujetos, ya que no presentaban una lesión medible ≥ 1 según la revisión centralizada independiente y a ciegas (BICR). El criterio de valoración principal de la TRO (respuesta completa + respuesta parcial) medida por tomografía computarizada o resonancia magnética y evaluada según RECIST 1.1 por el laboratorio de la BICR para sujetos con CPNM con mutación de KRAS G12C fue del 37,1 % (46 de 124 sujetos; IC del 95 %: 28,6; 46,2 %); tres (3) sujetos (2,4 %) alcanzaron una respuesta completa y 43 sujetos (34,7 %) alcanzaron una respuesta parcial.*

*Basado en el corte de datos del 1 de diciembre de 2020.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ser útil para resolver cualquier problema que pueda surgir. Para más información, consulte también la página de preguntas frecuentes de nuestro Centro de asistencia técnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx (para obtener información de contacto, visite www.qiagen.com). Los científicos del servicio técnico de QIAGEN estarán encantados de responder a las preguntas que pueda tener sobre la información o los protocolos de este manual, o sobre las tecnologías de preparación de muestras y de ensayo (para obtener información de contacto, visite www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Resultados no válidos

- | | |
|---|---|
| a. Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes no cumplían con las instrucciones indicadas en "Obtención y preparación de materiales de muestras para el análisis y almacenamiento de los mismos" en la página 20. | 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 ha caducado. | Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y, si es necesario, utilice un <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit nuevo. |

Las muestras NTC muestran resultados positivos en el canal FAM

Comentarios y sugerencias

Se ha producido contaminación durante la preparación de la PCR.

Repita la PCR con nuevos reactivos en duplicados.

Si es posible, cierre los tubos de PCR inmediatamente después de añadir la muestra que se desea analizar.

Asegúrese de descontaminar el espacio de trabajo y los instrumentos a intervalos regulares.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

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.
- Lièvre, 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

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

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene reactivos suficientes para 24 reacciones
	Fecha de caducidad
	Marcado CE para Europa
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material (p. ej., el etiquetado de los componentes)
	Número mundial de artículo comercial
	Contiene

Símbolo

Definición del símbolo



Componentes



Número

Rn

«R» es la revisión de las Instrucciones de uso y «n» es el número de revisión



Límite de temperatura



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso



Mantener alejado de la luz solar



Precaución, consulte los documentos adjuntos



Advertencia/Precaución

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y obtener más información, póngase en contacto con nuestro centro de asistencia técnica en support@qiagen.com.

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

Esta sección contiene instrucciones para utilizar el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit con Software Rotor-Gene Q versión 2.3.5 en modo abierto (es decir, sin utilizar el *therascreen* KRAS Assay Package).

Información general

- Para conocer los materiales necesarios, consulte "Materiales necesarios pero no suministrados" en la página 14.
- Para obtener instrucciones completas sobre la preparación y la disposición de las muestras, consulte "Protocolo: evaluación de muestras de ADN" en la página 26 y "Protocolo: detección de mutaciones del KRAS" en la página 40.

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

Los parámetros de ciclado se muestran en Tabla 37.

Tabla 37. Parámetros de ciclado

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

1. Haga doble clic en el icono del software Software Rotor-Gene Q versión 2.3.5 en el escritorio del portátil conectado al instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Seleccione la pestaña **Advanced** (Avanzado) en la ventana New Run (Nueva serie) que aparece.
2. Para crear una plantilla nueva, seleccione **Empty Run** (Serie vacía) y, a continuación, 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 bloqueo esté colocado y marque la casilla **Locking Ring Attached**. Haga clic en **Next** (Siguiente) (Figura 26).

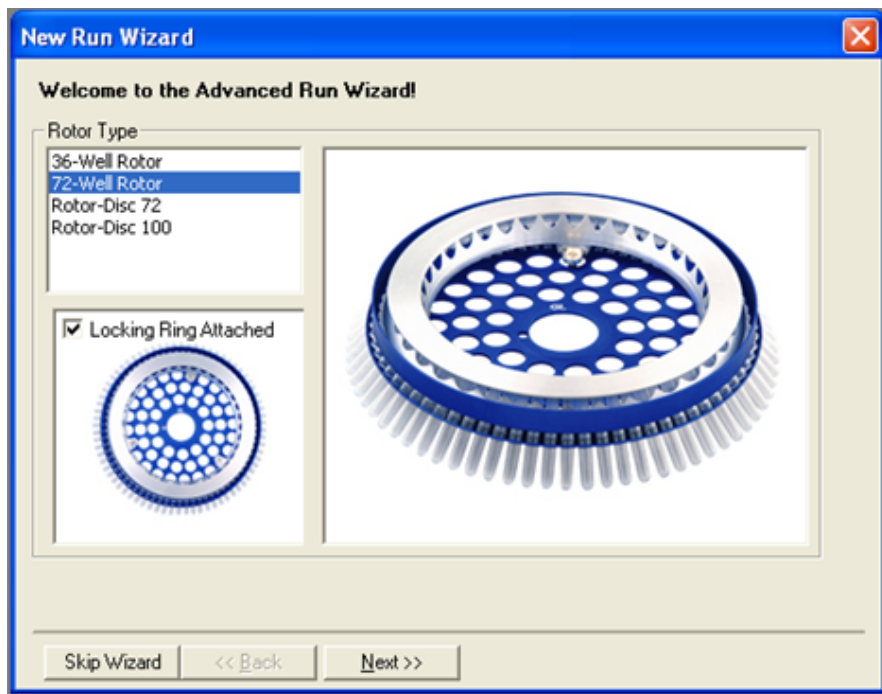


Figura 26. Cuadro de diálogo del New Run Wizard. 1 = "Rotor type" (Tipo de rotor), 2 = casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de bloqueo sujeto), 3 = "Next" (Siguiente).

4. Introduzca el nombre del usuario. Añada las notas que desee e introduzca el volumen de reacción como **25**. Asegúrese de que el campo **Sample Layout** (Disposición de las muestras) contenga el valor **1, 2, 3....** Haga clic en **Next** (Figura 27).

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator :

Notes :

Reaction Volume (µL):

Sample Layout :

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

Skip Wizard << Back Next >>

Figura 27. Introducción del nombre del operario y de los volúmenes de reacción. 1 = campo de diálogo "Operator", 2 = campo de diálogo "Notes", 3 = campo "Reaction Volume", 4 = "Sample Layout", 5 = "Next".

5. Haga clic en **Edit Profile** (Editar perfil) en la ventana "New Run Wizard" (Figura 28) y programe el perfil de temperatura según la información de los pasos siguientes.

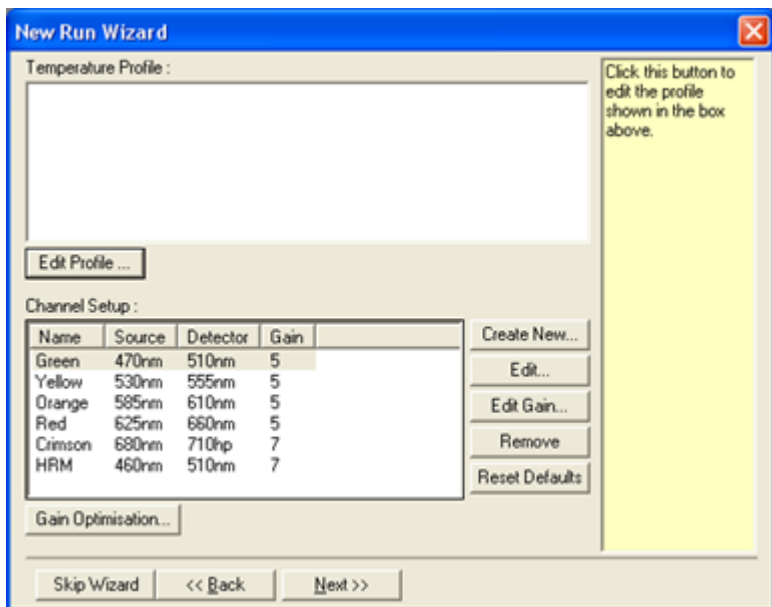


Figura 28. Edición del perfil.

- Haga clic en **Insert after** (Insertar después) y seleccione **New Hold at Temperature** (Nueva fase de temperatura) (Figura 29).

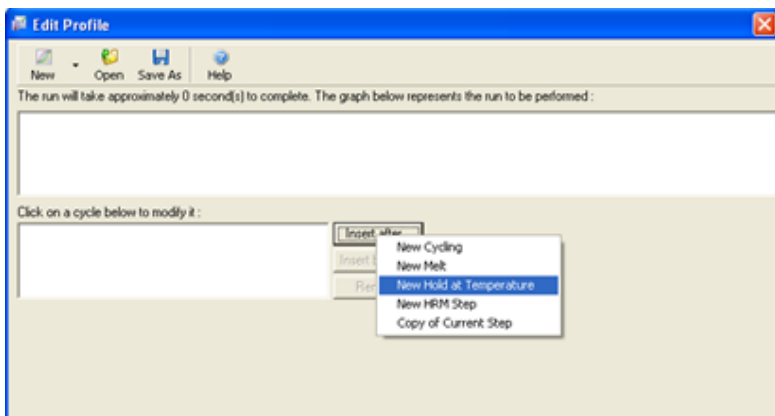


Figura 29. Inserción de un paso de incubación inicial. 1 = "Insert after" (Insertar después), 2 = "New Hold at Temperature" (Nueva fase de temperatura).

7. Ajuste el valor del campo **Hold Temperature** (Mantener temperatura) a **95 °C** y el del campo **Hold Time** (Mantener tiempo) a **15 min 0 s**. Haga clic en **Insert After** y, a continuación, seleccione **New Cycling** (Ciclo nuevo) (Figura 30).

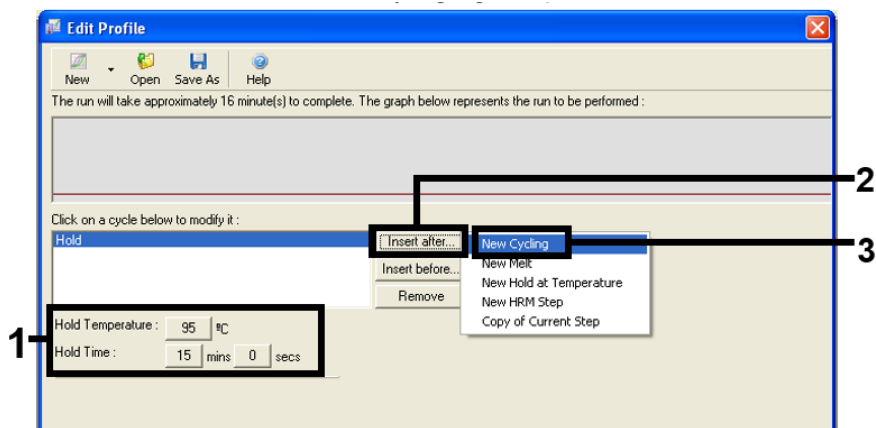


Figura 30. Paso de incubación inicial a 95 °C. 1 = "Hold Temperature" y "Hold Time", 2 = Insert after, 3 = New Cycling.

8. Establezca el número de repeticiones de ciclo en **40**. Seleccione el primer paso y establézcalo en **95 °C for 30 secs** (Figura 31).

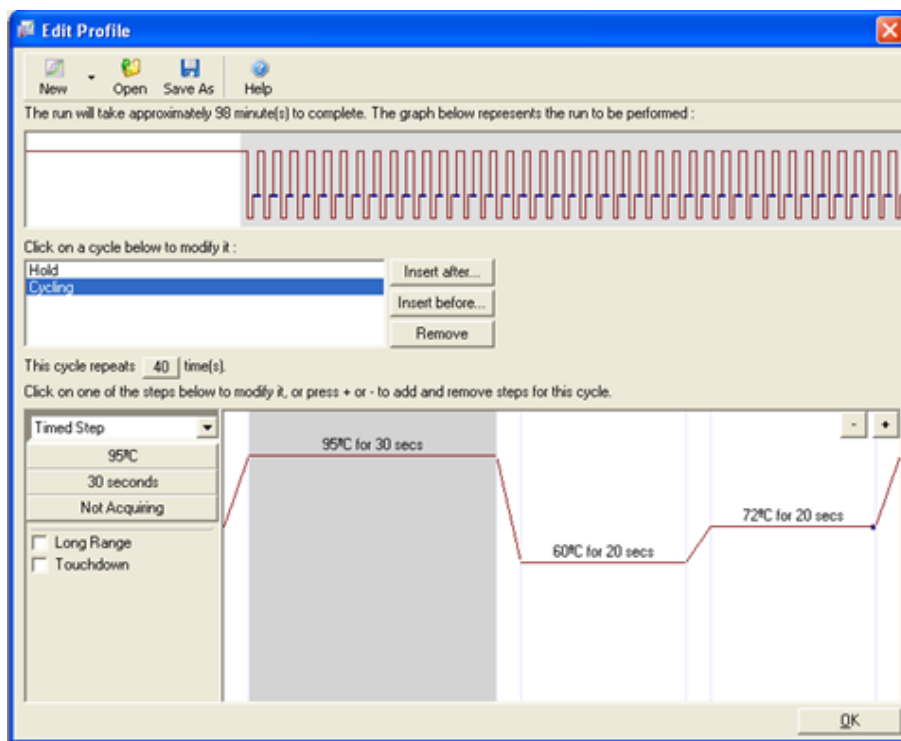


Figura 31. Paso de ciclado a 95 °C. 1 = casilla "Cycle repeats", 2 = ajuste de temperatura del paso uno, 3 = ajuste de tiempo del paso uno.

9. Resalte el segundo paso y establézcalo en **60 °C durante 60 s**. Para habilitar la adquisición de datos durante este paso, haga clic en **Not Acquiring** (Sin adquisición) (Figura 32).

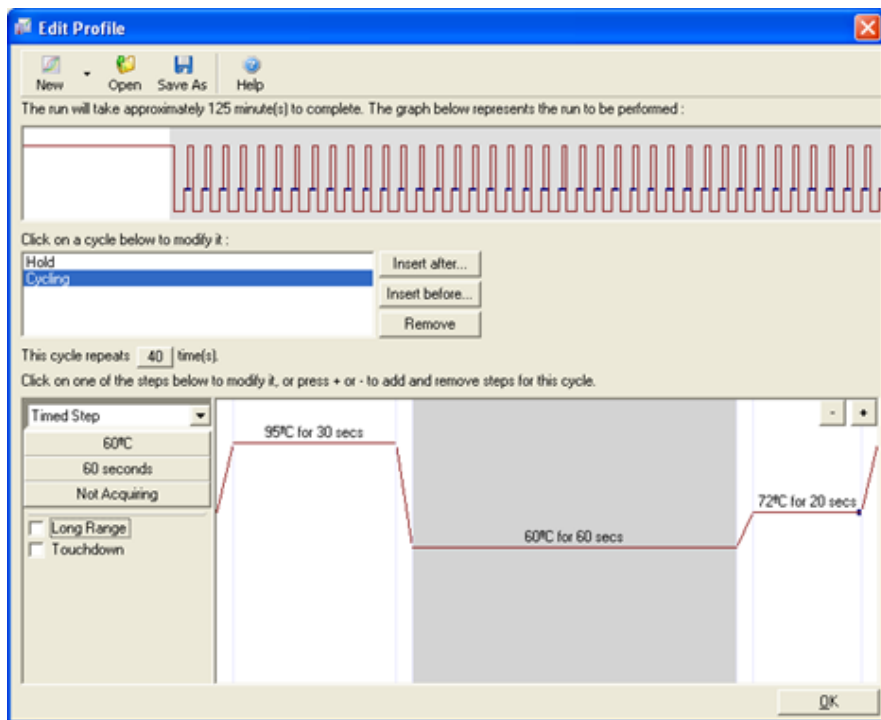


Figura 32. Paso de ciclado a 60 °C. 1 = ajuste de temperatura y tiempo del segundo paso, 2 = Not Acquiring.

10. En la lista Available Channels, seleccione **Green** (Verde) y **Yellow** (Amarillo) y, a continuación, haga clic en > para moverlos a la lista Acquiring Channels. Haga clic en **OK** (Figura 33).

Acquisition

Same as Previous : (New Acquisition) ▼

Acquisition Configuration :

Available Channels :

Name
Crimson
HRM
Orange
Red

> < <<

Acquiring Channels :

Name
Green
Yellow

To acquire from a channel, select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a channel, select it in the right-hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<.

Dye Chart >> Don't Acquire Help

Dye Channel Selection Chart

Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM ¹ , SYBR Green 1 ¹ , Fluorescein, EvaGreen ¹ , Alexa Fluor 488 ¹
Yellow	530nm	555nm	JOE ¹ , VIC ¹ , HEX, TET ¹ , CAL Fluor Gold 540 ¹ , Yakima Yellow ¹
Orange	585nm	610nm	ROX ¹ , CAL Fluor Red 610 ¹ , Cy3.5 ¹ , Texas Red ¹ , Alexa Fluor 568 ¹
Red	625nm	660nm	Cy5 ¹ , Quasar 670 ¹ , Alexa Fluor 633 ¹
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 ¹ , Alexa Fluor 680 ¹
HRM	460nm	510nm	SYTO 9 ¹ , EvaGreen ¹

Figura 33. Adquisición en el paso de ciclado a 60 °C.

11. Seleccione el tercer paso y haga clic en - para eliminarlo. Haga clic en **OK** (Figura 34).

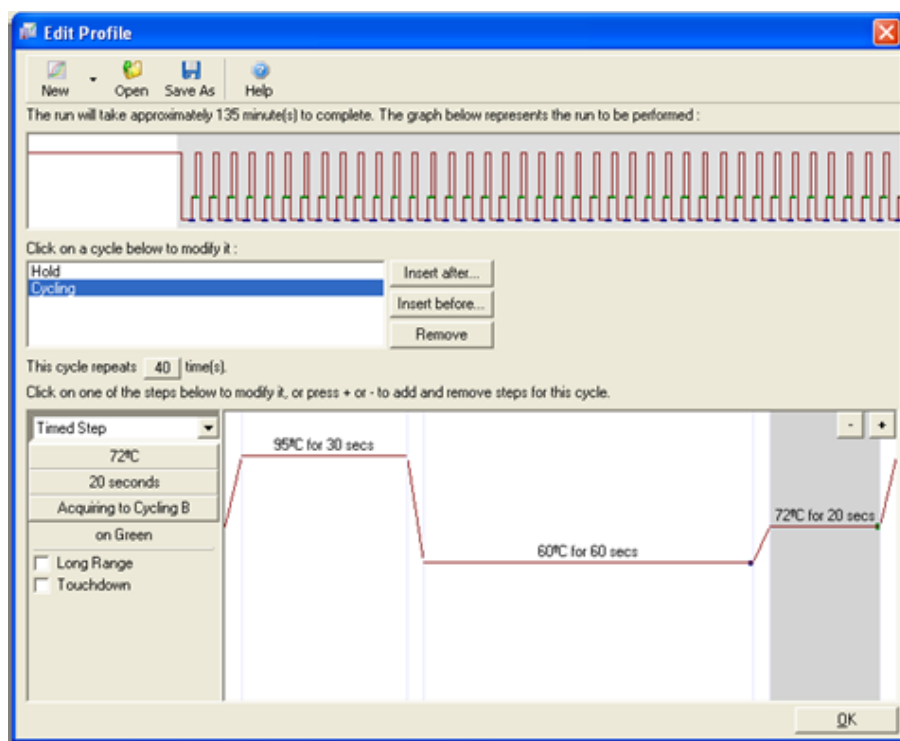


Figura 34. Paso de eliminación de extensión.

12. En la siguiente ventana, haga clic en **Gain Optimization** (Optimización de ganancia) (Figura 35).

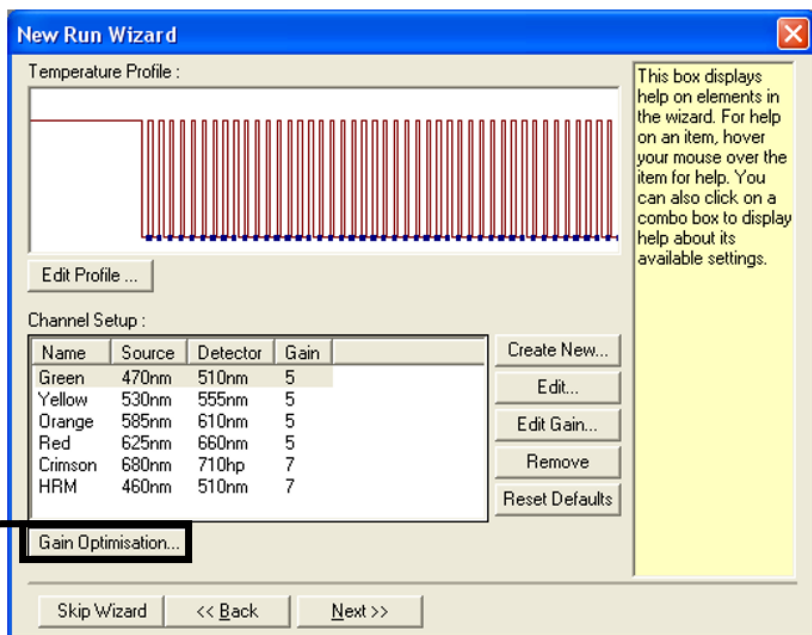


Figura 35. Optimización de la ganancia.

- Haga clic en **Optimize Acquiring** (Optimizar adquisición). Para cada canal, se muestra la configuración de canal. Haga clic en **OK** para aceptar los valores predeterminados. (Figura 36).

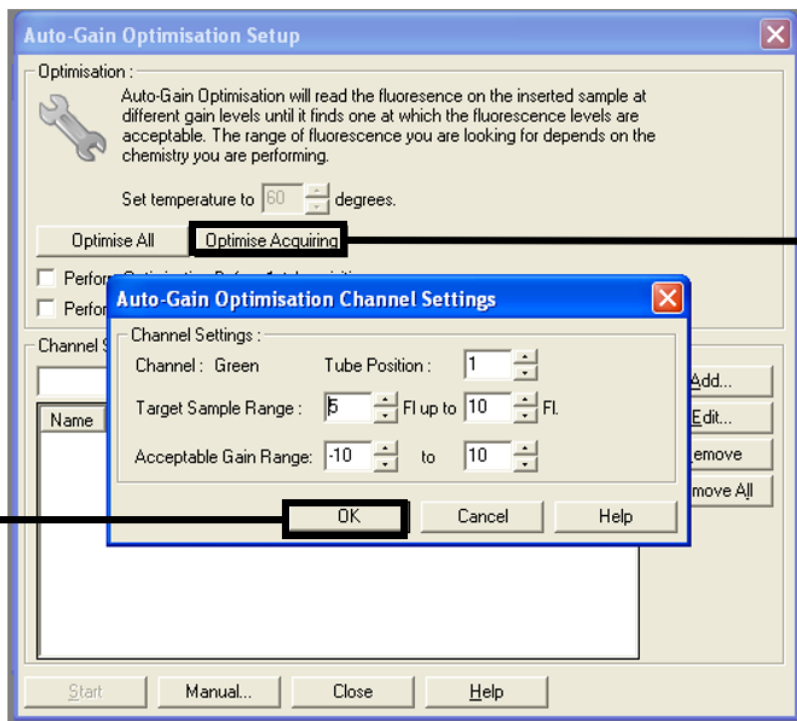


Figura 36. Optimización de la ganancia automática para el canal verde.

14. Marque la casilla **Perform Optimization before 1st Acquisition** (Ejecutar la optimización antes de la primera adquisición) y, a continuación, haga clic en **Close** (Cerrar) para volver al asistente (Figura 37).

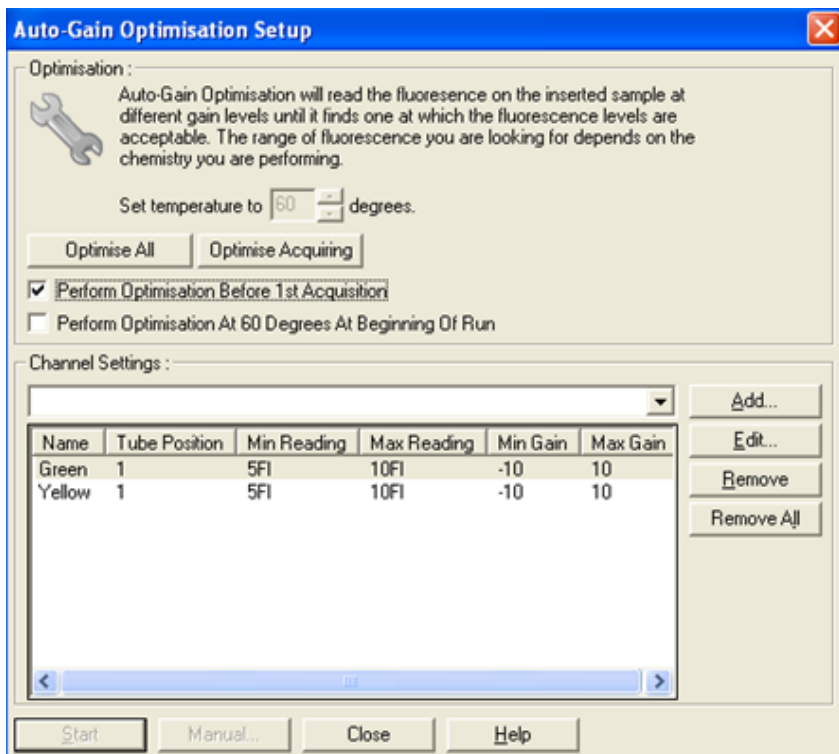


Figura 37. Selección de los canales verde y amarillo.

- Haga clic en **Next**. A continuación, haga clic en **Save** (Guardar) para guardar la plantilla en la ubicación adecuada.

Protocolo: Evaluación de las muestras (manual)

Este protocolo se utiliza para evaluar el ADN total amplificable en las muestras y debe realizarse antes del análisis de mutaciones de KRAS.

- Prepare las muestras según se describe en "Protocolo: evaluación de muestras de ADN" en la página 26.
- Configure el ciclo de PCR en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM según se describe en "Protocolo: configuración de theascreen KRAS PCR RGQ" a continuación.
- Una vez finalizado el ciclo, analice los datos según las instrucciones de Sample assessment data analysis.

Protocolo: detección de mutaciones de KRAS (manual)

Una vez que la muestra haya superado la evaluación, se puede analizar para detectar mutaciones de KRAS.

- Prepare las muestras según se describe en "Protocolo: evaluación de muestras de ADN" en la página 26.
- Configure el ciclo de PCR en el instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM según se describe en "Protocolo: configuración de theascreen KRAS PCR RGQ" a continuación.
- Una vez finalizado el ciclo, analice los datos según las instrucciones de Sample assessment data analysis.

Protocolo: configuración de *therascreen* KRAS PCR RGQ

1. Abra el Software Rotor-Gene Q versión 2.3.5 y el perfil de temperatura creado adecuado.
2. Cree el perfil de temperatura según "Protocolo: creación de un perfil de temperatura" en la página 148.

Asegúrese de que esté seleccionado el rotor correcto y marque la casilla **Locking Ring Attached**. Haga clic en **Next** (Figura 38).

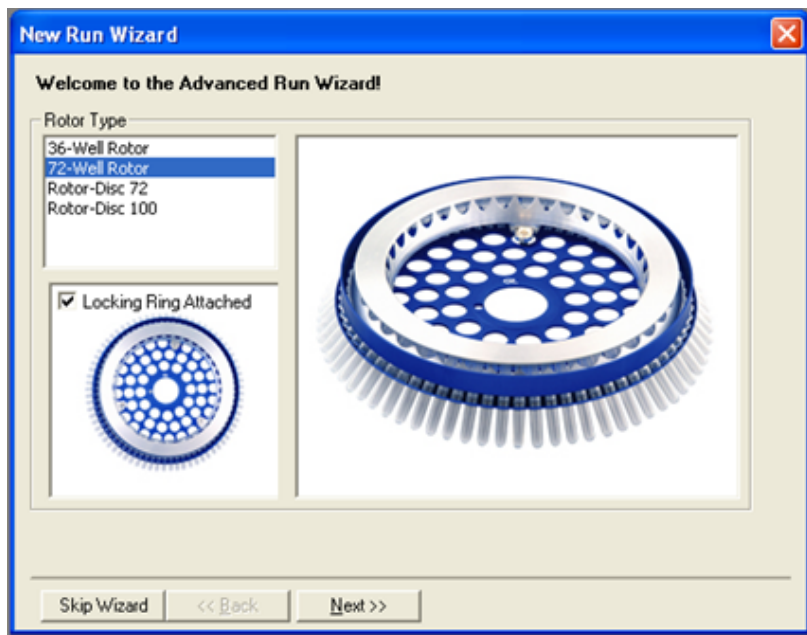


Figura 38. Cuadro de diálogo “New Run Wizard” y pantalla de bienvenida. 1 = “Rotor type”, 2 = casilla “Locking Ring Attached”, 3 = “Next”.

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 la muestra) incluya el valor **1, 2, 3...**. Haga clic en **Next** (Figura 39).

Figura 39. Cuadro de diálogo “New Run Wizard”. 1 = campos “Operator” (Usuario) y “Notes” (Notas), 2 = campos “Reaction Volume” (Volumen de reacción) y “Sample Layout” (Disposición de muestras), 3 = “Next” (Siguiente).

4. Deje todos los valores como aparecen en la ventana siguiente. No es necesario realizar ninguna edición, ya que el perfil de temperatura se ha creado según las instrucciones de "Protocolo: creación de un perfil de temperatura" en la página 148. Haga clic en **Next** (Figura 40).

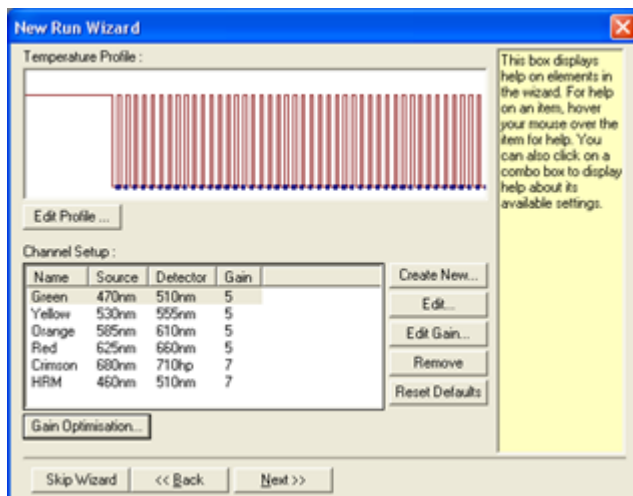


Figura 40. Cuadro de diálogo “New Run Wizard” y pantalla de edición de temperatura. 1 = “Next” (Siguiente).

5. Revise el resumen y haga clic en **Start Run** para guardar el archivo de la serie e iniciarla (Figura 41).

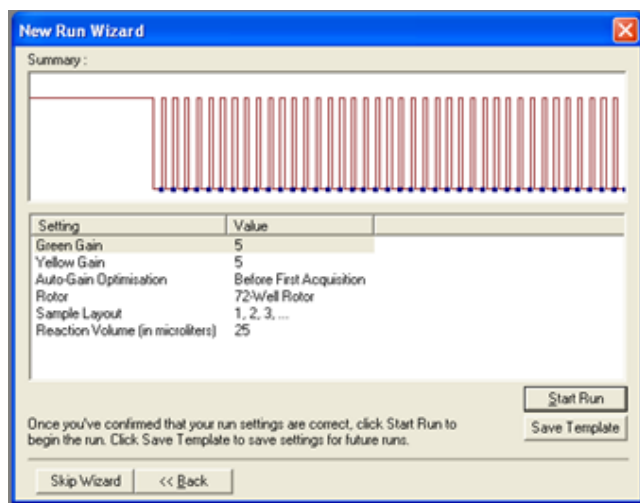


Figura 41. Cuadro de diálogo “New Run Wizard”. 1 = “Start Run” (Iniciar la serie).

Nota: Una vez iniciada la serie, aparece una nueva ventana en la que puede introducir los nombres de las muestras en ese momento o hacer clic en **Finish** (Finalizar) e introducirlos más tarde seleccionando el botón **Sample** (Muestra) durante la serie o una vez que esta haya finalizado.

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 asignar nombres a 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 Sample assessment data analysis o KRAS mutation detection analysis,, según corresponda.
7. Si se requieren informes de cuantificación, haga clic en el icono **Reports** (Informes) de la barra de herramientas del archivo de la serie de Rotor-Gene Q.

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: 1 ensayo de control, 7 ensayos de mutación, control positivo, agua, ADN polimerasa <i>Taq</i>	874011
Rotor-Gene Q y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador Real-time PCR y analizador de fusión de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) más canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador Real-time PCR y analizador de fusión de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) más canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en 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 DSP DNA FFPE Tissue Kit, para la purificación de ADN genómico obtenido de tejidos incorporados en para- fina		

Producto	Contenido	N.º de cat.
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: columnas de centrifugación QIAamp Mini, proteinasa K, tampones, reactivos y Collection Tubes (2 mL)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: columnas de centrifugación QIAamp Mini, proteinasa K, tampones, reactivos y Collection Tubes (2 mL)	56404

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

Historial de revisiones del documento

Revisión	Descripción
R5, noviembre de 2019	Se ha cambiado el fabricante legal (portada) Se ha eliminado el símbolo EC + REP de la portada y del apartado de Símbolos 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 Se ha actualizado el protocolo Detección de mutaciones de KRAS para incluir el paso adicional en la preparación de mezclas maestras Valores corregidos en las columnas de frecuencia e intervalo de confianza del 95 % de la tabla 9. Se ha actualizado el porcentaje de concordancia global de CRC de 96,4 % a 96,82 % Valores corregidos en la columna C95 de LoD de la tabla 14

Revisión

Descripción

R6, noviembre de 2020

Se ha corregido la versión del paquete therascreen KRAS Assay Package a la 3.0.3

Se ha actualizado todo el documento en relación con la disponibilidad para la descarga del paquete de ensayos en www.qiagen.com

Se ha añadido una nota en todo el documento sobre las acciones relacionadas con los marcadores para la indicación de NSCLC actualizado para garantizar el correcto funcionamiento del kit

Se ha añadido una nota en todos los procedimientos de este documento sobre la mezcla correcta de reactivos. Se ha actualizado la sección Precauciones generales

Se ha añadido una nota para la correcta colocación del equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Se ha añadido una nota sobre el uso de bisturís secos. Protocolo actualizado: "Evaluación de muestras de ADN", para añadir puntos importantes adicionales antes de comenzar. Protocolo actualizado: sección "Detección de mutaciones de KRAS", para añadir puntos importantes adicionales antes de comenzar y una nota sobre las muestras de CPM para interpretar varias señales como no válidas

Sección de marcadores de Rotor-Gene Q therascreen KRAS Assay Package actualizada para añadir tablas que ilustren los marcadores de RGQ y las acciones recomendadas

Interpretación de los resultados relativa a las acciones relacionadas con los marcadores actualizada. Se ha actualizado la sección "Guía de resolución de problemas" para añadir tablas que ilustren los indicadores RGQ, sus significados y las acciones recomendadas

Se ha actualizado la sección "Limitaciones" para añadir información sobre las muestras de CPM

Se ha revisado la sección "Características de rendimiento" para actualizar los datos de las tablas

Se ha actualizado la sección "Entrada de ADN y linealidad"

Se ha actualizado la sección "Repetibilidad y reproducibilidad"

Revisión	Descripción
	Se ha actualizado la sección "Variabilidad en el manejo de las muestras" Se ha añadido la sección "Rendimiento clínico" Se ha actualizado la sección "Análisis de datos de evaluación de la muestra" para revisar la solución recomendada para un Ct del ensayo de control de la muestra >32 Se ha añadido el marcado de conformidad europea a la sección "Símbolos" Se ha actualizado la sección "Interpretación de los resultados (manual)" en relación con las acciones vinculadas a los indicadores. Se ha actualizado la sección "Protocolo: detección de mutaciones de KRAS" para incluir los pasos sobre cómo preparar las mezclas maestras

Revisión	Descripción
R7, Mayo de 2026	Se ha actualizado la sección "Materiales necesarios pero no suministrados" Se ha actualizado la sección "Advertencias y precauciones" para añadir una indicación de peligro y un consejo de prudencia Se ha actualizado Obtención y preparación de materiales de muestras para el análisis y almacenamiento de los mismos para añadir información sobre el almacenamiento de muestras de CPNM Se ha actualizado la sección Protocolo: extracción de ADN Se ha añadido una nota relativa a la ADN polimerasa Taq en la sección "Procedimiento" de Protocolo: evaluación de muestras de ADN Se han añadido indicadores RGQ en "Interpretación de los resultados" Se ha actualizado la sección "Limitaciones" • Se ha añadido información sobre la tasa de prevalencia poco frecuente • Se ha modificado la alineación del texto para aclarar que el diseño de la prueba es tanto para muestras de CCR como de CPNM Se han actualizado varias secciones en Performance Characteristics for CRC Specimens regarding NSCLC and CRC claims Se han vuelto a añadir PC_MUTATION_ASSAY_FAIL y PC_CTRL_INVALID_DATA en la columna de indicadores de Guía de resolución de problemas Indicadores actualizados en Guía de resolución de problemas Se ha corregido la referencia al QIAamp Kit en Información para pedidos Actualización importante del diseño

Acuerdo de licencia limitada para el *therascreen*® KRAS RGQ PCR Kit

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

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el mismo y a estas instrucciones de uso y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el panel. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, estas instrucciones de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales los han proporcionado usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. Estos protocolos no han sido probados ni optimizados exhaustivamente por QIAGEN. QIAGEN no los garantiza ni garantiza que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este panel ni sus usos 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 toda responsabilidad respecto a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del panel aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este panel y/o con sus componentes.

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

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, *therascreen*®, HotStarTaq®, MinElute®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, RNeasy® (QIAGEN Group); Balversa™ (Janssen Research & Development, LLC), TaqMan® (Roche Group). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no 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 CONCEDE AL COMPRADOR DERECHOS, EN VIRTUD DE DETERMINADAS PATENTES DE ROCHE, PARA UTILIZARLO EXCLUSIVAMENTE CON EL FIN DE PRESTAR SERVICIOS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO EN SERES HUMANOS. POR LA PRESENTE NO SE CONCEDE NINGUNA LICENCIA GENERAL DE PATENTE NI DE OTRO TIPO, SALVO ESTE DERECHO ESPECÍFICO DE USO DERIVADO DE LA COMPRA.

05/2026 HB-1861-007 1134665 © 2026 QIAGEN, todos los derechos reservados.

