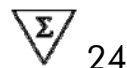


# Manual del PyroMark KRAS Kit



Versión 1



El PyroMark KRAS Kit con el marcado CE-IVD permite la determinación cuantitativa de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS humano. Ofrece a los médicos información para facilitar la selección de los pacientes con cáncer colorrectal con más posibilidades de beneficiarse de los tratamientos anti-EGFR.

Para uso diagnóstico *in vitro*



971450



1056444ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R2

MAT

1056444ES



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN es el principal proveedor de tecnologías innovadoras para muestras y ensayos que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios avanzados de alta calidad garantizan el éxito desde la muestra hasta el resultado.

### **QIAGEN marca pautas en:**


- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación de microARN y ARNi
- Automatización de tecnologías para muestras y ensayos

Nuestro cometido consiste en permitir que nuestros clientes consigan éxitos y avances excepcionales. Para obtener más información, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).










# Índice

<b>Contenido del kit</b>	<b>4</b>
<b>Símbolos</b>	<b>4</b>
<b>Transporte y conservación</b>	<b>5</b>
<b>Indicaciones</b>	<b>5</b>
<b>Limitaciones del uso del producto</b>	<b>6</b>
<b>Asistencia técnica</b>	<b>6</b>
<b>Control de calidad</b>	<b>7</b>
<b>Información de seguridad</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>8</b>
Principios y procedimiento	8
Eficacia diagnóstica	9
<b>Equipo y reactivos que debe aportar el usuario</b>	<b>14</b>
<b>Notas importantes</b>	<b>15</b>
Precauciones generales	15
Material de muestras	15
Aislamiento de ADN	15
Controles	16
<b>Protocolo 1: Configuración de procesos para el PyroMark Q24 MDx</b>	<b>17</b>
<b>Protocolo 2: PCR utilizando el HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit y el PyroMark KRAS Kit</b>	<b>19</b>
<b>Protocolo 3: Inmovilización de productos de PCR en micropartículas Streptavidin Sepharose High Performance</b>	<b>22</b>
<b>Protocolo 4: Preparación de muestras antes del análisis Pyrosequencing en el PyroMark Q24 MDx</b>	<b>24</b>
<b>Protocolo 5: Procesamiento con el PyroMark Q24 MDx</b>	<b>27</b>
<b>Protocolo 6: Análisis de un proceso del PyroMark Q24 MDx</b>	<b>29</b>
<b>Guía para la solución de problemas</b>	<b>34</b>
<b>Apéndice A: Configuración de ensayos PyroMark KRAS</b>	<b>36</b>
<b>Apéndice B: Vaciado del recipiente de residuos y de las cubetas</b>	<b>38</b>
<b>Referencias</b>	<b>39</b>
<b>Información para pedidos</b>	<b>40</b>

## Contenido del kit

<b>PyroMark KRAS Kit</b>	<b>(24)</b>
<b>N.º de catálogo</b>	<b>971450</b>
<b>Número de reacciones</b>	<b>24</b>
Seq Primer KRAS 12/13	24 µl
Seq Primer KRAS 61	24 µl
PCR Primer KRAS 12/13	24 µl
PCR Primer KRAS 61	24 µl
Wt KRAS Control DNA	100 µl
Mutant KRAS Control DNA	100 µl
Manual	 1

## Símbolos

 <N>	Contiene reactivos para <N> pruebas
	Fecha de caducidad
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material
	Componentes
	Contiene
	Número



Límites de temperatura



Fabricante legal



Consulte la información del manual



Nota importante

## Transporte y conservación

El PyroMark KRAS Kit se transporta en hielo seco y debe conservarse a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  una vez recibido. Evite congelar y descongelar el producto muchas veces ( $>5$ ). El PyroMark KRAS Kit se mantendrá estable hasta su fecha de caducidad si se conserva en estas condiciones.

## Indicaciones

El análisis de las mutaciones del gen KRAS suscita mucho interés en Europa, debido a que la Comisión Europea ha autorizado la comercialización condicional de panitumumab y cetuximab para el tratamiento del cáncer de colon metastásico en pacientes con el gen KRAS no mutado (natural). Esto significa que el panitumumab y el cetuximab sólo pueden administrarse a pacientes en los que se ha determinado el estado mutacional del KRAS.

El uso indicado tiene como finalidad facilitar a los médicos la identificación de los pacientes con cáncer colorrectal que tienen más posibilidades de beneficiarse de los tratamientos anti-EGFR, como el panitumumab y el cetuximab. El kit está indicado como complemento de otros factores pronósticos utilizados actualmente para seleccionar a los pacientes adecuados para los tratamientos anti-EGFR sobre la base del estado mutacional de los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS de los pacientes. Antes de tomar una decisión sobre el tratamiento, el médico debe considerar el estado mutacional del paciente junto con otros factores patológicos. El tratamiento de los pacientes con cáncer no debe basarse únicamente en estado mutacional del KRAS.

El producto está concebido para la determinación cuantitativa de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS humano. El producto consta de 2 ensayos: uno detecta mutaciones en los codones 12 y 13, y el segundo detecta mutaciones en el codón 61. Ambos ensayos contienen cebadores de PCR específicos y un cebador de secuenciación.

## Limitaciones del uso del producto

Los resultados obtenidos con el producto deben interpretarse dentro del contexto de todos los datos clínicos y de laboratorio relevantes.

Este producto sólo puede utilizarlo personal formado especialmente en procedimientos de diagnóstico *in vitro* y en el sistema PyroMark Q24 MDx.

Se realizaron estudios de validación con ADN humano extraído de muestras de tumores fijadas en formol e incluidas en parafina.

El producto no incluye los materiales necesarios para la purificación de ADN, la amplificación por PCR y la preparación de muestras para el análisis Pyrosequencing®. El producto se ha validado con productos de purificación de ADN y reactivos de PCR de QIAGEN. Utilice los productos de amplificación por PCR y purificación de ADN recomendados, que se especifican en las páginas 14 y 15.

El producto está concebido para utilizarse únicamente en el sistema PyroMark Q24 MDx.

Para obtener resultados óptimos es necesario seguir estrictamente las instrucciones del manual del usuario. La dilución de los reactivos, aparte de la forma descrita en este manual, no está recomendada y disminuirá la eficacia del producto.

Debe prestarse atención a las fechas de caducidad y a las condiciones de conservación impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados o conservados incorrectamente.

## Asistencia técnica

En QIAGEN estamos muy orgullosos de la calidad y la disponibilidad de nuestro servicio de asistencia técnica. El personal de nuestros departamentos de servicio técnico incluye científicos experimentados con amplios conocimientos teóricos y experiencia práctica en tecnologías para muestras y ensayos, así como en el uso de los productos QIAGEN. Si desea hacer alguna pregunta o está experimentando alguna dificultad con el PyroMark KRAS Kit o con los productos de QIAGEN en general, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

Los clientes de QIAGEN son una importante fuente de información sobre usos avanzados o especializados de nuestros productos. Esta información es útil para otros científicos, así como para los investigadores de QIAGEN. Por lo tanto, lo animamos a que se ponga en contacto con nosotros si desea hacer algún comentario o sugerencia sobre la eficacia del producto o sobre nuevas aplicaciones y técnicas.

Para obtener asistencia técnica y más información, visite nuestro Centro de Asistencia Técnica en [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) o llame a uno de los

departamentos de servicio técnico o a uno de los distribuidores locales de QIAGEN (consulte la contraportada o visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## **Control de calidad**

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad con certificado ISO de QIAGEN, cada lote del PyroMark KRAS Kit se comprueba para verificar que cumple las especificaciones predeterminadas a fin de asegurar una calidad uniforme del producto.

## **Información de seguridad**

Al trabajar con productos químicos, lleve siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las Material Safety Data Sheets (MSDS) (fichas de datos de seguridad) adecuadas. Las MSDS de todos los kits y los componentes de los kits QIAGEN están disponibles en Internet en formato PDF, práctico y compacto, en [www.qiagen.com/support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/support/MSDS.aspx), donde se pueden buscar, consultar e imprimir.

### **Servicio de información de emergencia (disponible 24 horas al día)**

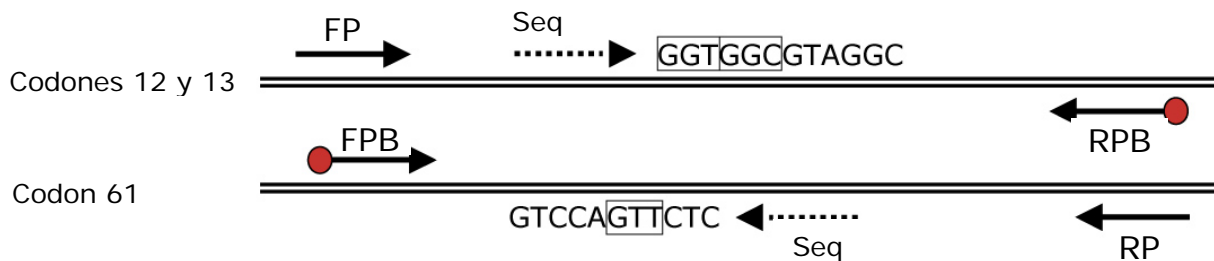
En el siguiente número puede obtenerse información médica de urgencia en inglés, francés y alemán 24 horas al día:

Die Beratungsstelle bei Vergiftungen (Centro de Información Toxicológica)  
Mainz, Alemania

Tel.: +49-6131-19240

## Introducción

El PyroMark KRAS Kit con el marcado CE-IVD permite realizar determinaciones cuantitativas de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS humano. El producto consta de 2 ensayos: uno para detectar mutaciones en los codones 12 y 13, y el segundo para detectar mutaciones en el codón 61. Las dos regiones se amplifican separadamente por PCR y se secuencian a través de la región definida. Las secuencias adyacentes a las posiciones definidas sirven como picos de normalización y referencia para la cuantificación y la evaluación de la calidad del análisis.



**Figura 1. Ilustración del ensayo KRAS.** La secuencia indicada es la secuencia analizada en una muestra normal. **FP** y **FPB**: cebadores anterógrados de PCR (B indica biotilación); **RP** y **RPB**: cebadores inversos de PCR (B indica biotilación); **Seq**: cebadores de secuenciación.

**i** Los codones 12 y 13 se secuencian en dirección anterógrada, y el codón 61, en dirección retrógrada.

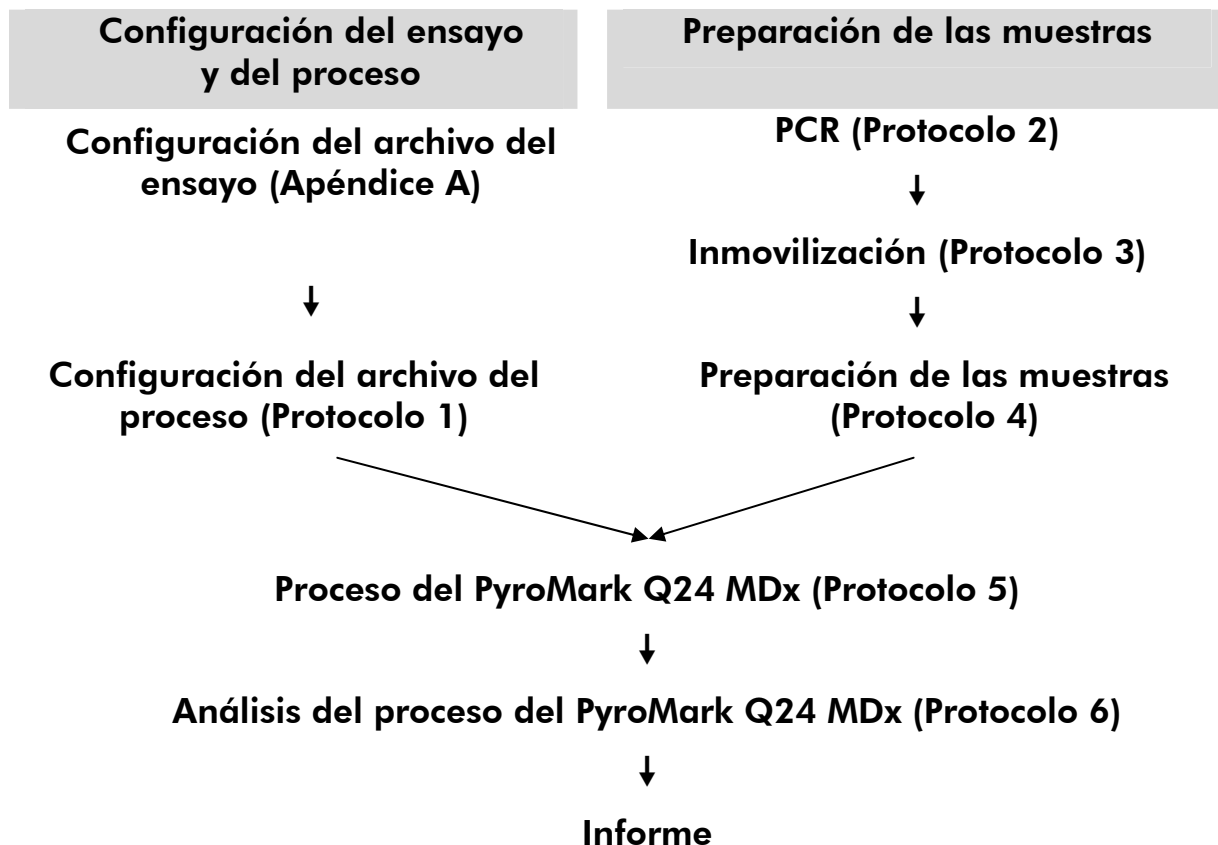
El producto consta de una mezcla de cebadores de PCR y un cebador de secuenciación para cada ensayo. Los cebadores se suministran en solución. Cada frasco contiene 24  $\mu$ l de cada cebador o mezcla de cebadores.

## Principios y procedimiento

El diagrama de flujo de la página 9 ilustra el procedimiento del ensayo. Tras la PCR con cebadores dirigidos a los codones 12 y 13 y al codón 61, los amplicones se inmovilizan sobre micropartículas Streptavidin Sepharose High Performance. Se prepara ADN monocatenario y se hibrida con los cebadores de secuenciación correspondientes. A continuación se analizan las muestras en el PyroMark Q24 MDx, empleando un archivo de configuración del proceso y un archivo del proceso. El parámetro «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) puede ajustarse para la detección de mutaciones infrecuentes después del proceso (consulte «Protocolo 6: Análisis de un proceso del PyroMark Q24 MDx», página 29, y el apéndice A, página 36).



## Diagrama de flujo del procedimiento PyroMark KRAS



## Eficacia diagnóstica

### Límite del blanco y límite de detección

Se han determinado el límite del blanco (LDB) y el límite de detección (LDD) correspondientes a una serie de mutaciones empleando mezclas de plásmidos similares a las suministradas con el kit. Se emplearon dos métodos, dependiendo del tipo de mutación.


- **Mutaciones que provocan la aparición de un pico en una posición que de otra manera habría estado en blanco:** el LDB y el LDD se determinaron siguiendo las recomendaciones de la pauta EP17-A del NCCLS, «Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline» (Protocolo para la determinación de límites de detección y límites de cuantificación: pauta aprobada). Los errores  $\alpha$ - y  $\beta$ - (positivos falsos y negativos falsos, respectivamente) se ajustaron a un 5%.
- **La mutación GGT → GTT en el codón 12:** esta mutación provoca cambios que incluyen picos unitarios y dobles, y no da una respuesta lineal a niveles bajos de mutación. Esta posición dio siempre un LDB de 0 unidades porcentuales ( $n = 72$ ). La señal más baja que indica la presencia de una mutación en esta posición se ajustó a 1 unidad

porcentual, lo que está claramente por encima del nivel basal constante de 0 unidades porcentuales. Al analizar una muestra que contenía una mutación de 7 unidades porcentuales, el 95% de los resultados ( $n = 89$ ) dio una señal que pudo considerarse positiva ( $\geq 1$  unidad porcentual). Por lo tanto, el LDD de esta mutación se ajustó a 7 unidades porcentuales, y todas las muestras que dieron una señal por encima de 1 unidad porcentual se consideraron positivas para esta mutación.

**Tabla 1. LDB y LDD determinados para mutaciones específicas**

Mutación	LDB (%)	LDD (%)	ID de COSMIC* (V42)
<b>Codón 12 (GGT)</b>			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	n.p.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
<b>Codón 13 (GGC)</b>			
GAC	0,3	1,9	532
<b>Codón 61 (CAA), analizado en orientación inversa (TTG)</b>			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

\* Del Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de mutaciones somáticas en el cáncer), disponible en la web del Sanger Institute en [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).  
n.p.: no procede.

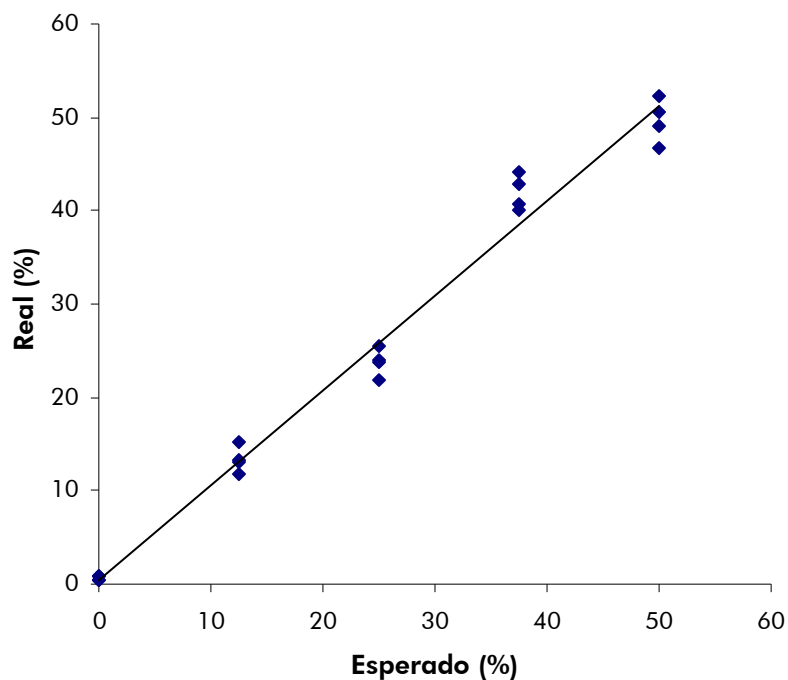
 Estos valores se basaron en procesos en los que la señal fue de más de 60 RLU, tal como obtiene habitualmente con 10 ng de ADN aislado a partir de

tejido fijado en formol e incluido en parafina. Se recomienda confirmar el rendimiento del método en el laboratorio.

## Linealidad

La linealidad se determinó de acuerdo con el documento EP6-A del Clinical and Laboratory Standards Institute, «Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline» (Evaluación de la linealidad de los procedimientos de determinación cuantitativa: un enfoque estadístico; pauta aprobada).

Se mezclaron secuencias normales y mutantes en proporciones pensadas para producir los siguientes niveles de mutación: 0, 12,5, 25, 37,5 y 50%. Se colocaron cuatro réplicas de las mezclas formando un patrón aleatorio sobre una placa, y se analizaron. Los resultados correspondientes a la mutación GGT → TGT en el codón 12 se analizaron con la versión 2.04 del software Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd., Reino Unido) y se muestran en la figura 2.



**Figura 2. Linealidad de la mutación GGT → TGT en el codón 12.**

La repetibilidad global fue de 1,64 unidades porcentuales y los resultados fueron lineales dentro de una no-linealidad permisible de un 3%. Los resultados correspondientes a la mutación GGC → GAC en el codón 13 fueron similares.

## Imprecisión intermedia

La determinación de la linealidad de la mutación GGT → TGT en el codón 12 fue repetida por 3 operadores en 3 días distintos, empleando diferentes combinaciones del instrumento PyroMark Q24 MDx y los PyroMark Gold Q24 Reagents. Los resultados de los 3 procesos se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Imprecisión intermedia**

Esperado	Proceso 1		Proceso 2		Proceso 3		Resumen	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
0,0	0,6	0,2	1,7	0,7	0,7	0,2	1,0	0,6
12,5	13,3	1,5	16,2	1,9	14,6	3,0	14,7	1,4
25,0	23,8	1,4	26,8	2,4	26,9	2,9	25,8	1,8
37,5	42,0	1,9	41,7	0,5	38,5	2,6	40,7	2,0
50,0	49,7	2,4	50,5	1,8	49,1	4,8	49,8	0,7

Todos los valores están expresados en unidades porcentuales. DE: desviación estándar.

Los valores correspondientes a la imprecisión intermedia (DE) fueron por tanto de 0,6-2,0 unidades porcentuales en el intervalo medido de 0-50%.

## Sensibilidad y especificidad diagnósticas

El PyroMark KRAS Kit se evaluó en un estudio. Se utilizó el DxS Therascreen®: K-RAS Mutation Kit para realizar una comparación de los resultados obtenidos en 100 muestras prospectivas de tumores malignos colorrectales analizadas para comprobar las mutaciones de los codones 12 y 13.

El ADN empleado para los análisis se aisló empleando el EZ1 DNA Tissue Kit, y los análisis se realizaron con el PyroMark KRAS Kit en el PyroMark Q24 MDx y con el Therascreen: K-RAS Mutation Kit en el ABI PRISM® 7900HT SDS.

El análisis DxS permitió determinar el estado mutacional de 91 de las 100 muestras. El análisis Pyrosequencing permitió determinar el estado mutacional de los codones 12 y 13 en 94 muestras.

Si se excluyen las muestras cuyo estado no pudo determinarse con uno o ambos kits, la correlación del PyroMark KRAS Kit y el Therascreen: K-RAS Mutation Kit fue del 100%. La sensibilidad diagnóstica del PyroMark KRAS Kit fue del 100%, y la especificidad diagnóstica fue también del 100% (tabla 3).

**Tabla 3. Resultados correspondientes a los codones 12 y 13 de las muestras prospectivas de tumores malignos colorrectales analizadas**

		Therascreen: K-RAS Mutation Kit		
		Mutante	Natural	Total
PyroMark KRAS Kit	Mutante	33	0	33
	Natural	0	57	57

### **Análisis del codón 61**

Se utilizó el PyroMark KRAS Kit para analizar las mismas 100 muestras y determinar las mutaciones del codón 61. Sólo una muestra dio una evaluación de calidad fallida para el ensayo del codón 61. Esta muestra también falló en los ensayos PyroMark y Therascreen de los codones 12 y 13, lo que indica que la calidad del ADN era demasiado baja. La mayor tasa de éxito del ensayo del codón 61 indica que depende menos de la calidad del ADN que los ensayos PyroMark y Therascreen de los codones 12 y 13. Como el ensayo Therascreen no comprueba la presencia de mutaciones en el codón 61, no es posible realizar una comparación directa de los ensayos.

En 4 de las 99 muestras se detectaron mutaciones en el codón 61. Tres tenían mutaciones frecuentes (CAC, CAT y CTA) en el codón 61, mientras que la cuarta muestra tenía mutaciones tanto en el codón 60 (GGT → GGA) como en el codón 61 (CAA → AAA).

## Equipo y reactivos que debe aportar el usuario

Al trabajar con productos químicos, lleve siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las Material Safety Data Sheets (MSDS) (fichas de datos de seguridad) correspondientes, que pueden solicitarse al proveedor del producto.

- Kit de aislamiento de ADN (consulte «Aislamiento de ADN», página 15)
- Pipetas (ajustables)\*
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Microcentrífuga de sobremesa\*
- Reactivos de PCR (el PyroMark KRAS Kit se validó empleando el HotStarTaq® Plus Master Mix Kit, n.º de cat. 203643, 203645 ó 203646)
- Termociclador\* y tubos de PCR adecuados
- Streptavidin Sepharose™ HighPerformance (GE Healthcare, n.º de cat. 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 MDx (n.º de cat. 9001513)\*†
- PyroMark Q24 MDx Software (n.º de cat. 9019063)†
- PyroMark Q24 Plate (n.º de cat. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (n.º de cat. 979302)†
- PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (n.º de cat. 9001515 ó 9001517)\*†
- PyroMark Gold Reagents (n.º de cat. 971802)†
- PyroMark Binding Buffer (n.º de cat. 979306)†
- PyroMark Denaturation Solution (n.º de cat. 979307)†
- PyroMark Wash Buffer, concentrate (n.º de cat. 979308)†
- PyroMark Annealing Buffer (n.º de cat. 979309)†
- Mezcladora de placas\* para la inmovilización en las micropartículas
- Bloque de calentamiento\* capaz de alcanzar los 80 °C
- Tiras o placa de PCR de 24 pocillos
- Tiras de tapas
- Agua de alta pureza (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm o equivalente)
- Etanol (70%)

\* Asegúrese de que los instrumentos se hayan comprobado y calibrado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

† Marcado CE-IVD de acuerdo con la Directiva 98/79/CE de la UE. Todos los demás productos enumerados no tienen el marcado CE-IVD basado en la Directiva 98/79/CE de la UE.

## Notas importantes

### Precauciones generales

- ① El usuario siempre debe prestar atención a lo siguiente:
  - Utilice puntas de pipeta estériles con filtro.
  - Conserve y extraiga los materiales positivos (muestras, controles positivos y amplicones) separados de todos los demás reactivos, y añádalos a la mezcla de reacción en unas instalaciones separadas espacialmente.
  - Descongele bien todos los componentes a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de iniciar un ensayo.
  - Una vez descongelados, mezcle los componentes (pipeteándolos repetidamente hacia arriba y hacia abajo, o agitándolos en pulsos cortos en un agitador vórtex) y centrifúgelos brevemente.

### Material de muestras

① Todas las muestras tienen que tratarse como material potencialmente infeccioso.

El material de las muestras es ADN humano extraído de sangre o de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina.

① No deben utilizarse muestras de personas que estén en tratamiento con heparina. No deben utilizarse muestras de sangre que se hayan recogido en tubos que contengan heparina como anticoagulante. La heparina afecta a la PCR.

### Aislamiento de ADN

Se recomienda utilizar los kits de QIAGEN mostrados en la tabla 4 para purificar el ADN obtenido de los tipos de muestras humanas indicadas, a fin de utilizarlo con el PyroMark KRAS Kit. Purifique el ADN siguiendo las instrucciones de los manuales de los kits.

**Tabla 4. Kits de purificación de ADN recomendados para su uso con el PyroMark KRAS Kit**

<b>Material de muestras</b>	<b>Kit de aislamiento de ácidos nucleicos</b>	<b>Número de catálogo (QIAGEN)</b>
Tejido incluido en parafina	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1® DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sangre	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

\* Siguiendo el protocolo para el uso con tejido incluido en parafina. El EZ1 DNA Tissue Kit está indicado para utilizarse junto con el EZ1 Advanced (n.º de cat. 9001410 ó 9001411) y la EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (n.º de cat. 9018298), con el EZ1 Advanced XL (n.º de cat. 9001492 ó 9001493) y la EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (n.º de cat. 9018700), o con el BioRobot® EZ1 (n.º de cat. 9000705; que ya no se comercializa) y la EZ1 DNA Paraffin Section Card (n.º de cat. 9015862).

† Marcado CE-IVD de acuerdo con la Directiva 98/79/CE de la UE.

## Controles

**i** El producto incluye dos controles positivos. Éstos sirven como controles para las reacciones PCR y de secuenciación. El wt KRAS Control DNA contiene la secuencia normal del KRAS, y el Mutant KRAS Control DNA contiene mutaciones en los 3 codones. Ambos controles tienen bases cambiadas en el codón 15 y en el codón 59 para distinguirlos del ADN genómico. Los controles pueden incluirse por separado en el análisis o mezclarse en las proporciones que se deseen. Las secuencias de los controles se muestran en la tabla 5.

**i** Para analizar el Mutant KRAS Control DNA, ajuste la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) a **NGTGRCGTAGGYA**, dirigida a la primera base del codón 12 (consulte el apéndice A, página 36).

**Tabla 5. Secuencias de los controles**

<b>Control</b>	<b>Codón 12</b>	<b>Codón 13</b>	<b>Codón 15</b>	<b>Codón 59</b>	<b>Codón 61</b>
Normal	GGT	GGC	GGT	GTA	CAA
Mutado	TGT	GAC	GGT	GTA	CAC

**i** Además, siempre debe incluirse un control negativo (sin ADN molde).



# Protocolo 1: Configuración de procesos para el PyroMark Q24 MDx



## Cuestión importante antes de empezar


- Si es necesario, el LDB puede confirmarse empleando una muestra normal o el wt KRAS Control DNA suministrado para generar una placa entera de resultados. Para obtener información más detallada, consulte la pauta EP17-A del NCCLS, «Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline» (Protocolo para la determinación de límites de detección y límites de cuantificación: pauta aprobada).

## Antes de empezar

- Cree una configuración de ensayo como se describe en el apéndice A. Esto sólo tiene que hacerse una vez, antes de realizar el ensayo PyroMark KRAS por primera vez (consulte el apéndice A, página 36).


## Procedimiento

1. Haga clic en el icono  de la barra de herramientas.  
Se creará un nuevo archivo de proceso.
2. Introduzca los parámetros del proceso (consulte el apartado «Parámetros de los procesos», a continuación).
3. Configure la placa añadiendo ensayos para los codones 12 y 13 y para el codón 61 a los pocillos correspondientes a las muestras que desee analizar. Se recomienda utilizar como controles una muestra negativa (sin ADN), y el wt KRAS Control DNA y el Mutant KRAS Control DNA suministrados.
4. Una vez que el proceso se haya configurado y esté listo para llevarse a cabo en el PyroMark Q24 MDx: imprima una lista de los volúmenes requeridos de mezcla enzimática, mezcla de sustrato y nucleótidos, así como la configuración de la placa. Seleccione “Pre Run Information” (Información previa al proceso) en el menú «Tools» (Herramientas) y, cuando aparezca el informe, haga clic en . Cierre el archivo del proceso y cópielo a un lápiz USB (suministrado con el sistema) empleando el Explorador de Windows®.

 La información previa al proceso impresa puede utilizarse como plantilla para la configuración de las muestras (consulte «Protocolo 3: Inmovilización de productos de PCR en micropartículas Streptavidin Sepharose High Performance», página 22).

Para procesar la placa en el PyroMark Q24 MDx, consulte «Protocolo 5: Procesamiento con el PyroMark Q24 MDx», página 27.

## Parámetros de los procesos

Run name (Nombre del proceso):	El nombre del proceso se asigna al guardar el archivo. Al cambiar el nombre del archivo se cambia también el nombre del proceso.
Instrument method (Método del instrumento):	Seleccione el método del instrumento según los reactivos y el cartucho que se vayan a utilizar para el proceso; consulte las instrucciones suministradas con los productos.
Plate ID (Identificador de placa):	<b>Opcional:</b> introduzca el identificador de la PyroMark Q24 Plate.
Bar code (Código de barras):	<b>Opcional:</b> introduzca un número de código de barras para la placa o bien, si tiene un lector de códigos de barras conectado al ordenador, ponga el cursor del ratón en el cuadro de texto «Barcode» (Código de barras) (haciendo clic en el cuadro) y lea el código de barras con el lector.
Reagent ID (Identificador de reactivos):	<b>Opcional:</b> Introduzca el número de lote de los PyroMark Gold Q24 Reagents que se vayan a utilizar. El número de lote está indicado en la etiqueta del producto.   Recomendamos introducir el identificador de los reactivos para poder rastrear cualquier problema inesperado que pueda surgir con ellos.
Run note (Nota del proceso):	<b>Opcional:</b> introduzca una nota sobre el contenido o el propósito del proceso.

## Añada los archivos de los ensayos

Para añadir un ensayo a un pocillo, puede escoger una de las opciones siguientes:

- Hacer clic con el botón derecho del ratón en el pocillo y seleccionar «Load Assay» (Cargar ensayo) en el menú contextual.
- Seleccionar el ensayo en el explorador de método abreviado, y hacer clic y arrastrar el ensayo al pocillo.

Los pocillos se codifican con colores según los ensayos que se les asocian.

## Introduzca los identificadores de las muestras y las notas

Para introducir un identificador de muestra o una nota, seleccione la celdilla e introduzca el texto.

Para modificar un identificador de muestra o una nota, seleccione la celdilla (se seleccionará el contenido actual) o haga doble clic en ella.

## Protocolo 2: PCR utilizando el HotStarTaq Plus Master Mix Kit y el PyroMark KRAS Kit

Este protocolo es para amplificaciones por PCR de una región que contenga el codón 12 y el codón 13, y otra amplificación por PCR de una región que contenga el codón 61, empleando el PyroMark KRAS Kit.

### Cuestiones importantes antes de empezar

- La HotStarTaq Plus DNA Polymerase requiere un paso de activación de **5 minutos a 95 °C** (consulte el *Manual de la HotStarTaq Plus PCR*).
- Prepare todas las mezclas de reacción en una zona separada de la empleada para la purificación de ADN, la adición del ADN molde a la PCR, el análisis de productos de la PCR o la preparación de muestras antes del análisis Pyrosequencing.
- Utilice puntas desechables con filtros hidrófobos para minimizar la contaminación cruzada.

### Antes de empezar

- Antes de abrir los tubos de cebadores de PCR, centrifúguelos brevemente para que el contenido se deposite en el fondo de los tubos.
- Ajuste la concentración del ADN de la muestra, si es necesario, a 0,4-2 ng/μl.

### Procedimiento

#### 1. Descongele las soluciones de los cebadores y el ácido nucleico molde.

Mezcle bien los productos antes de utilizarlos.

#### 2. Prepare una mezcla de reacción para cada conjunto de cebadores de PCR como se indica en la tabla 6.

La mezcla de reacción suele contener todos los componentes para la PCR, excepto la muestra.

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

**Tabla 6. Preparación de una mezcla de reacción para cada mezcla de cebadores de PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volumen/reacción</b>
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix, 2x	12,5 $\mu$ l
PCR Primer KRAS 12/13 o PCR Primer KRAS 61	1 $\mu$ l
Agua de alta pureza	6,5 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

**3. Mezcle bien la mezcla de reacción y dispense 20  $\mu$ l en cada tubo de PCR.**

No es necesario mantener los tubos de PCR en hielo, ya que la HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase es inactiva a temperatura ambiente.

**4. Añada 5  $\mu$ l de ADN molde (2-10 ng de ADN genómico) a cada tubo de PCR (consulte la tabla 7) y mézclelos bien.**



Siempre debe incluirse un control negativo (sin ADN molde).



Incluya reacciones con wt KRAS Control DNA y Mutant KRAS Control DNA como controles positivos (consulte «Controles», página 16).

**Tabla 7. Preparación de la PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volumen/reacción</b>
Mezcla de reacción	20 $\mu$ l
ADN de la muestra	5 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

5. Programe el termociclador siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando las condiciones indicadas en la tabla 8.

**Tabla 8. Protocolo cíclico optimizado**

			<b>Comentarios</b>
<b>Paso de activación inicial:</b>	5 min	95 °C	La HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase se activa mediante este paso de calentamiento.
<b>Ciclo de 3 pasos:</b>			
Desnaturalización	20 s	95 °C	
Hibridación	30 s	53 °C	
Extensión	20 s	72 °C	
Número de ciclos	40		
<b>Extensión final:</b>	5 min	72 °C	

6. Coloque los tubos de PCR en el termociclador e inicie el programa cíclico.
7. Después de la amplificación, lleve a cabo el «Protocolo 3: Inmovilización de productos de PCR en micropartículas Streptavidin Sepharose High Performance».

## Protocolo 3: Inmovilización de productos de PCR en micropartículas Streptavidin Sepharose High Performance

Con este protocolo se inmoviliza el ADN molde en Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) antes del análisis en el PyroMark Q24 MDx.

### Antes de empezar

- Deje que todos los reactivos y soluciones requeridos alcancen la temperatura ambiente (15-25 °C) antes de empezar.


### Procedimiento

1. **Agite suavemente el frasco que contenga la Streptavidin Sepharose High Performance hasta lograr una solución homogénea.**
2. **Prepare una mezcla maestra para la inmovilización de ADN según la tabla 9. Prepare un volumen un 10% superior al requerido para el número total de reacciones que se vayan a realizar.**

Tabla 9. Mezcla maestra para la inmovilización de ADN

Componente	Volumen/muestra
Streptavidin Sepharose High Performance	2 $\mu$ l
PyroMark Binding Buffer	40 $\mu$ l
Agua de alta pureza	28 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>70 <math>\mu</math>l</b>

3. **Añada 70  $\mu$ l de la mezcla maestra a pocillos de una placa de PCR de 24 pocillos o a tiras de PCR de la forma predefinida en la configuración del proceso (consulte «Protocolo 1: Configuración de procesos para el PyroMark Q24 MDx», página 17).**
4. **Añada 10  $\mu$ l del producto de PCR biotinilado obtenido con el protocolo 2 a cada pocillo que contenga mezcla maestra de la forma predefinida en la configuración del proceso (consulte «Protocolo 1: Configuración de procesos para el PyroMark Q24 MDx», página 17).**

 El volumen total por pocillo debe ser de 80  $\mu$ l después de añadir la mezcla maestra y el producto de PCR.

**5. Selle la placa (o las tiras) de PCR empleando tiras de tapas.**

ⓘ Asegúrese de que no puedan producirse fugas entre los pocillos.

**6. Agite la placa de PCR a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 5-10 minutos a 1400 rpm.**

ⓘ Durante este paso, prepare la PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation para la preparación de las muestras de la forma descrita en el *Manual del usuario del PyroMark Q24*.

**7. Lleve a cabo inmediatamente el «Protocolo 4: Preparación de muestras antes del análisis Pyrosequencing con el PyroMark Q24 MDx».**

ⓘ Las micropartículas de sefarosa sedimentan rápidamente. La captura de las micropartículas debe tener lugar inmediatamente después de la agitación.

## Protocolo 4: Preparación de muestras antes del análisis Pyrosequencing en el PyroMark Q24 MDx

Con este protocolo se prepara ADN monocatenario y se hibrida el cebador de secuenciación con el molde antes del análisis Pyrosequencing en el PyroMark Q24 MDx.

### Cuestiones importantes antes de empezar

- Antes de abrir los tubos de cebadores de secuenciación, centrifúgelos brevemente para que el contenido se deposite en el fondo.
- Añada los 2 cebadores de secuenciación diferentes siguiendo el mismo patrón predefinido para la placa en la configuración del proceso (consulte «Protocolo 1: Configuración de procesos para el PyroMark Q24 MDx», página 17), dependiendo de la región del análisis (codones 12 y 13, o codón 61).

### Antes de empezar

- Coloque el PyroMark Q24 Plate Holder sobre un bloque de calentamiento a 80 °C para utilizarlo en el paso 17.

### Procedimiento

#### 1. Diluya una cantidad suficiente de cada cebador de secuenciación, Seq Primer KRAS 12/13 y Seq Primer KRAS 61, en PyroMark Annealing Buffer tal como se muestra en la tabla 10.

Prepare un volumen de cebador de secuenciación diluido superior al requerido para el número total de muestras que se vayan a secuenciar (para el número de muestras + una adicional).

**Tabla 10. Dilución de ejemplo de los cebadores de secuenciación**

Componente	Volumen/muestra	Volumen para 9 + 1 reacciones
Seq Primer KRAS 12/13 o Seq Primer KRAS 61	0,8 µl	8 µl
PyroMark Annealing Buffer	24,2 µl	242 µl
<b>Volumen total</b>	<b>25 µl</b>	<b>250 µl</b>



- Añada 25  $\mu$ l del cebador de secuenciación diluido a cada pocillo de la PyroMark Q24 Plate de acuerdo con la configuración del proceso (consulte «Protocolo 1: Configuración de procesos para el PyroMark Q24 MDx», página 17).**

**i** Guarde uno de los PyroMark Q24 Plate Holders (suministrados con la PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation) a temperatura ambiente (15-25 °C), y utilícelo como soporte al preparar y mover la placa.

- Coloque la placa (o las tiras) de PCR del Protocolo 3 y la PyroMark Q24 Plate sobre la mesa de trabajo (consulte la figura 3).**

**i** Asegúrese de que la placa esté en la misma orientación en la que estaba cuando se cargaron las muestras.

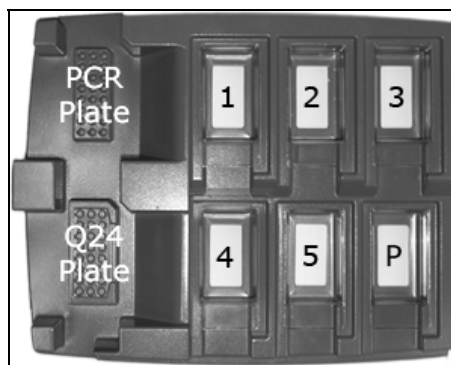


Figura 3. Colocación de la placa (o las tiras) de PCR y de la PyroMark Q24 Plate en la estación de trabajo de vacío.

- Aplique vacío a la herramienta abriendo el interruptor de vacío.**
  - Con cuidado, haga descender las sondas de filtro al interior de la placa (o las tiras) de PCR para capturar las micropartículas que contienen el molde inmobilizado. Mantenga las sondas en posición durante 15 s. Tenga cuidado al levantar la herramienta.**
- i** Las micropartículas de sefarosa sedimentan rápidamente. Si ha pasado más de 1 minuto desde la agitación de la placa (o las tiras), agite de nuevo durante 1 minuto antes de capturar las micropartículas.
- Transfiera la herramienta a la cubeta que contenga etanol al 70% (cubeta 1). Purgue las sondas de filtro durante 5 s.**
  - Transfiera la herramienta a la cubeta que contenga solución de desnaturalización (cubeta 2). Purgue las sondas de filtro durante 5 s.**
  - Transfiera la herramienta a la cubeta que contenga tampón de lavado (cubeta 3). Purgue las sondas de filtro durante 10 s.**
  - Levante la herramienta hacia arriba y hacia atrás (más allá de la vertical de 90°) durante 5 s a fin de vaciar de líquido las sondas de filtro (consulte la figura 4).**



Figura 4. Ilustración de la herramienta de vacío levantada hasta más allá de la vertical de 90°.

10. **Mientras mantiene la herramienta sobre la PyroMark Q24 Plate, cierre el interruptor de vacío de la herramienta (posición Off [Desactivado]).**
11. **Suelte las micropartículas en la placa que contenga los cebadores de secuenciación, agitando suavemente la herramienta de un lado a otro. Deje que las sondas de filtro reposen sobre el fondo de los pocillos.**
12. **Transfiera la herramienta a la cubeta que contenga agua sin nucleasa (cubeta 4) y agite la herramienta durante 10 s.**
13. **Lave las sondas de filtro haciéndolas descender hasta sumergirlas en agua sin nucleasa (cubeta 5) y aplicando vacío. Purgue las sondas con 70 ml de agua sin nucleasa.**
14. **Levante la herramienta hacia arriba y hacia atrás (más allá de la vertical de 90°) durante 5 s a fin de vaciar de líquido las sondas de filtro (consulte la figura 4).**
15. **Cierre el interruptor de vacío de la herramienta (posición Off [Desactivado]) y coloque la herramienta en la posición de aparcamiento (P).**
16. **Apague la bomba de vacío.**
  - ① Al final de un día de trabajo, los residuos líquidos y las soluciones restantes deben desecharse, y la PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation debe inspeccionarse para comprobar si presenta polvo o salpicaduras; consulte el apéndice B, página 38.
17. **Caliente la PyroMark Q24 Plate con las muestras a 80 °C durante 2 minutos empleando el PyroMark Q24 Plate Holder precalentado.**
18. **Retire la PyroMark Q24 Plate del portaplacas y deje que las muestras se enfríen a temperatura ambiente (15-25 °C) durante al menos 5 minutos.**
19. **Lleve a cabo el «Protocolo 5: Procesamiento con el PyroMark Q24 MDx».**

## Protocolo 5: Procesamiento con el PyroMark Q24 MDx


Este protocolo describe la carga de PyroMark Gold Q24 Reagents en el PyroMark Q24 Cartridge, y el inicio y la finalización de un proceso en el PyroMark Q24 MDx. Para consultar una descripción detallada de cómo se configura un proceso, consulte el *Manual del usuario del PyroMark Q24*.

### **Cuestión importante antes de empezar**


- El informe Pre Run information (Información previa al proceso), que se encuentra en el menú «Tools» (Herramientas) en la configuración del proceso (consulte «Protocolo 1: Configuración de procesos para el PyroMark Q24 MDx», página 17), ofrece información sobre el volumen de nucleótidos, enzima y tampón de sustrato necesarios para un ensayo específico.

### **Procedimiento**

- 1. Cargue el PyroMark Q24 Cartridge con los volúmenes adecuados de nucleótidos, enzima y tampones de sustrato.**
- 2. Abra la puerta del cartucho e inserte el cartucho de reactivos cargado, con la etiqueta mirando hacia fuera. Empuje el cartucho hasta introducirlo por completo y, a continuación, empújelo hacia abajo.**
- 3. Asegúrese de que la línea esté visible delante del cartucho y cierre la puerta.**
- 4. Abra el bastidor de sujeción de placas y coloque la placa sobre el bloque de calentamiento.**
- 5. Cierre el bastidor de sujeción de placas y la tapa del instrumento.**
- 6. Introduzca el lápiz USB (que contenga el archivo del proceso) en el puerto USB de la parte delantera del instrumento.**

 No retire el lápiz USB antes de que acabe el proceso.

- 7. Seleccione «Run» (Procesar) en el menú principal (utilizando los botones ▲ y ▼ de la pantalla) y pulse «OK» (Aceptar).**
- 8. Seleccione el archivo del proceso utilizando los botones ▲ y ▼ de la pantalla.**

 Para ver el contenido de una carpeta, seleccione la carpeta y pulse «Select» (Seleccionar). Para volver a la vista previa, pulse «Back» (Anterior).

- 9. Una vez seleccionado el archivo del proceso, pulse «Select» (Seleccionar) para iniciar el proceso.**

- 10. Una vez que finalice el proceso y que el instrumento confirme que el archivo del proceso se ha guardado en el lápiz USB, pulse «Close» (Cerrar).**
- 11. Retire el lápiz USB.**
- 12. Abra la tapa del instrumento.**
- 13. Abra la puerta del cartucho y retire el cartucho de reactivos levantándolo y tirando de él hacia fuera.**
- 14. Cierre la puerta.**
- 15. Abra el bastidor de sujeción de placas y retire la placa del bloque de calentamiento.**
- 16. Cierre el bastidor de sujeción de placas y la tapa del instrumento.**
- 17. Deseche la placa y limpie el cartucho.**
- 18. Analice el proceso siguiendo el «Protocolo 6: Análisis de un proceso del PyroMark Q24 MDx».**

## Protocolo 6: Análisis de un proceso del PyroMark Q24 MDx

Este protocolo describe el análisis de mutaciones de un proceso KRAS finalizado, utilizando el PyroMark Q24 MDx Software.

### Procedimiento

1. **Introduzca el lápiz USB (que contenga el archivo del proceso finalizado) en el puerto USB del ordenador.**
2. **Transfiera el archivo del proceso desde el lápiz USB al directorio deseado del ordenador utilizando el Explorador de Windows.**
3. **Abra el archivo del proceso en modo AQ del PyroMark Q24 MDx Software seleccionando «Open» (Abrir) en el menú «File» (Archivo) o haciendo doble clic en el archivo (👉) en el explorador de método abreviado.**
4. **Para analizar el proceso y obtener una visualización general de los resultados, haga clic en uno de los botones de análisis.**



Analizar todos los pocillos.



Analizar el pocillo seleccionado.

Los resultados de los análisis (frecuencias de alelos) y la evaluación de la calidad se muestran encima de la posición variable en el pirograma. Para obtener más detalles sobre cómo analizar un proceso, consulte el *Manual del usuario del PyroMark Q24*.

5. **Para generar un informe, seleccione *Full Report* (Informe completo) en la opción «Reports for AQ runs» (Informes de procesos AQ) del menú.**



Las mutaciones más frecuentes del KRAS se encuentran en el nucleótido 35 (segunda base del codón 12). Por lo tanto, la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) estándar definida en la Analysis Setup (Configuración del análisis) prevé la determinación de mutaciones en esta posición (consulte el apéndice A, página 36). Si una muestra contiene una mutación en el nucleótido 34 (primera base del codón 12), la «Sequence to Analyze» puede cambiarse para analizar también el estado mutacional de esta posición, tal como se describe en el apéndice A.

Las frecuencias actualizadas de las mutaciones del gen KRAS humano en los codones 12 y 13 y en el codón 61 se pueden obtener en la web del Sanger Institute [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).



Para obtener resultados fiables, recomendamos alturas de pico unitarias de más de 30 RLU. En la configuración del ensayo, la «required

peak height for passed quality» (altura de pico requerida para la aprobación de la calidad) debe ajustarse a 30 RLU (consulte el apéndice A y el Manual del usuario del PyroMark Q24).

**i** El informe de resultados Análisis AQ debe utilizarse para documentar la cuantificación de alelos. Las cifras mostradas en el pirograma están redondeadas y no muestran la cuantificación exacta.

### **i** **Reanálisis de muestras sin mutación detectada en el nucleótido 35 o con evaluación de calidad «Check» (Comprobar) o «Failed» (Fallida)**

Recomendamos encarecidamente reanalizar todas las muestras sin mutación detectada en el nucleótido 35, así como las muestras que obtengan una evaluación de calidad «Check» (Comprobar) o «Failed» (Fallida) con la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) dirigida a las mutaciones del nucleótido 34. Las evaluaciones de calidad «Check» y «Failed» podrían indicar un pico de referencia en una posición no esperada para una mutación del nucleótido 35. Un pico en cualquiera de 3 primeras dispensaciones muestra que hay una mutación presente en el nucleótido 34.

Para reanalizar y determinar mutaciones del nucleótido 34, vaya a «Analysis Setup» (Configuración del análisis) y cambie la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) de **GNTGRCGTAGGYA** a **NGTGRCGTAGGYA**. Pulse el botón «Apply» (Aplicar) y haga clic en «To All» (A todas) cuando aparezca la ventana «Apply Analysis Setup» (Aplicar la configuración de análisis).

### **i** **Reprocesamiento de muestras para la detección de mutaciones de bajo nivel**

Se recomienda encarecidamente incluir una muestra normal en cada proceso, para permitir la comparación. Cualquier muestra que muestre una frecuencia de mutación superior a la de la posición correspondiente en la muestra normal deberá examinarse en relación con la tabla que muestra el límite de detección (consulte la tabla 11, página 31). Las muestras también pueden compararse entre sí para revelar frecuencias de mutación anormalmente altas.

Como guía, las muestras que se sospeche que tengan una mutación en el intervalo comprendido entre el LDD (tabla 11) y el LDD + 3 unidades porcentuales deberán reanalizarse por duplicado junto con una muestra normal por duplicado. Si ambos duplicados dan el mismo resultado que el análisis original y son visiblemente diferentes del control normal, entonces la muestra puede considerarse positiva para la mutación. Tenga en cuenta que las decisiones relacionadas con el tratamiento de pacientes de cáncer no deben basarse únicamente en el estado mutacional del KRAS.

ⓘ Si se sospecha la existencia de una mutación GGT → GTT, un resultado superior al 1% puede considerarse positivo. Este nivel puede variar considerablemente entre réplicas (consulte «Límite del blanco y límite de detección», página 9).

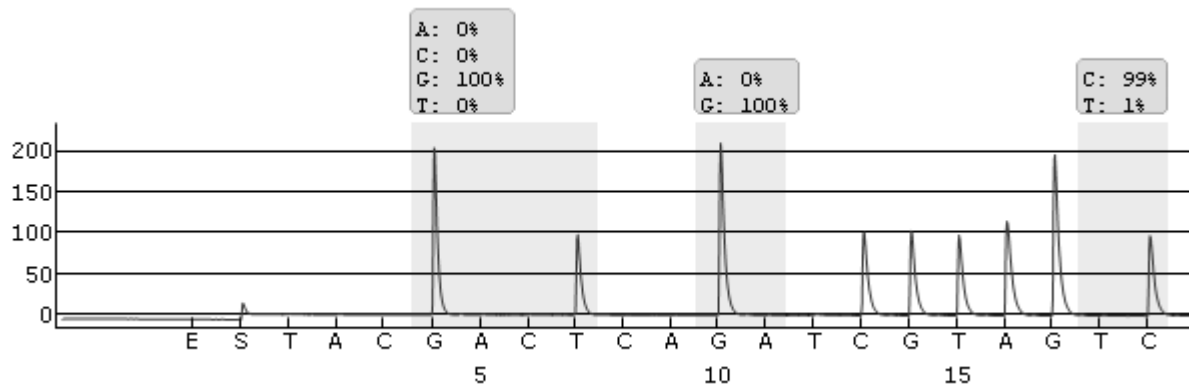
**Tabla 11. LDB y LDD determinados para mutaciones específicas**

Mutación	LDB (%)	LDD (%)	ID de COSMIC* (V42)
<b>Codón 12 (GGT)</b>			
GAT	0,6	2,2	521
GTT	n.p.	7,0	520
TGT	0,5	2,1	516
AGT	0,4	1,9	517
GCT	0,7	2,3	522
CGT	0,3	1,8	518
<b>Codón 13 (GGC)</b>			
GAC	0,3	1,9	532
<b>Codón 61 (CAA), analizado en orientación inversa (TTG)</b>			
GTG	0,8	2,8	554
TAG	1,2	3,1	553
TCG	1,6	3,5	552
ATG	0,7	2,6	555
TTC	1,2	3,1	550

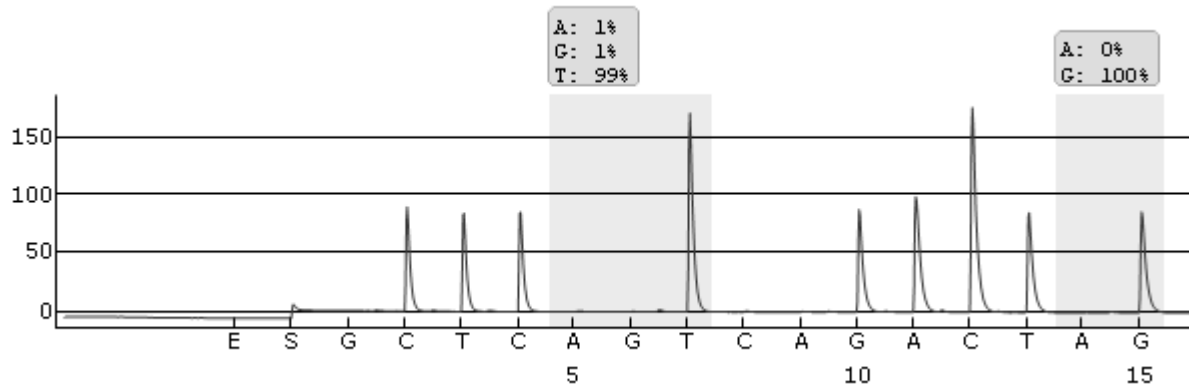
\* Del Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de mutaciones somáticas en el cáncer), disponible en la web del Sanger Institute en [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).  
n.p.: no procede.

## Resultados representativos

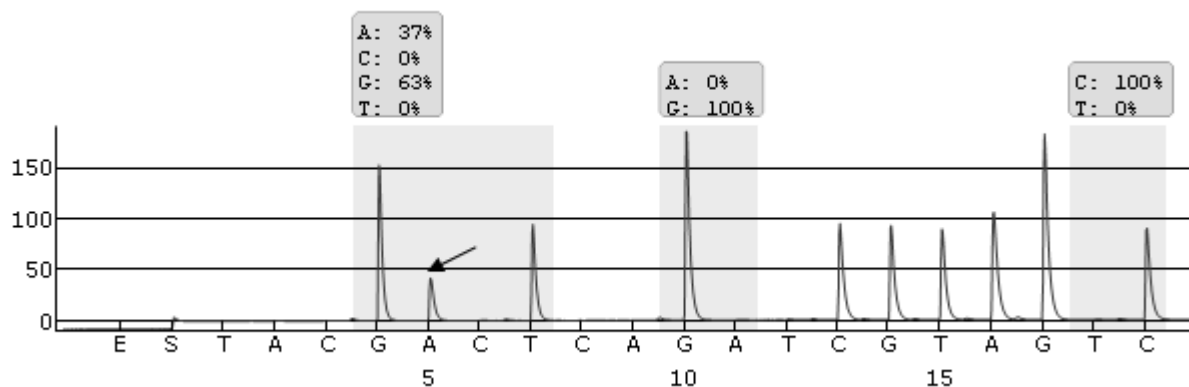
Los resultados de pirogramas representativos se muestran en las figuras 5-10.



**Figura 5.** Pirograma obtenido después del análisis de una muestra con un genotipo normal en los codones 12 y 13.

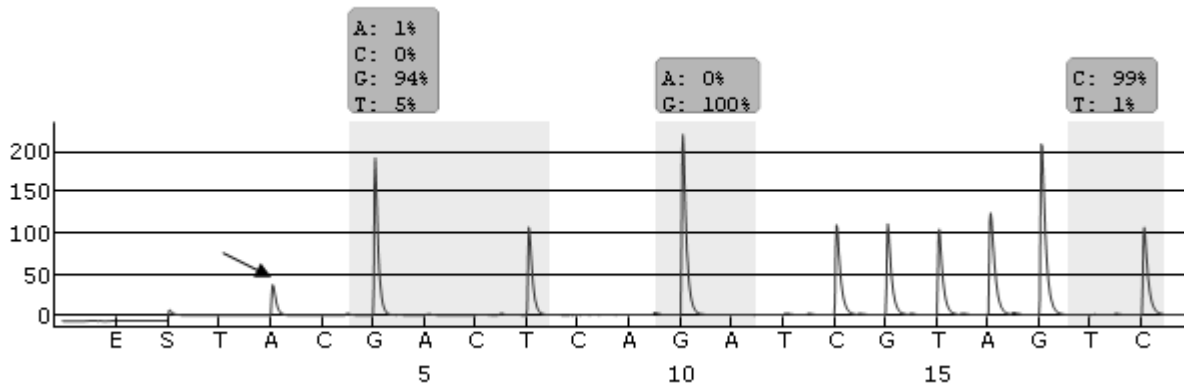


**Figura 6.** Pirograma obtenido después del análisis de una muestra con un genotipo normal en el codón 61.

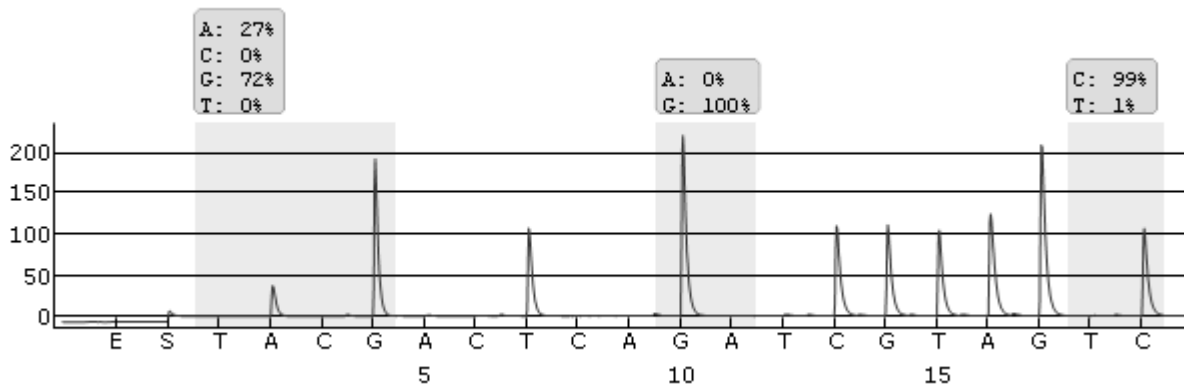


**Figura 7.** Pirograma obtenido después del análisis de muestras con una mutación GGT → GAT en la base 2 del codón 12 (nucleótido 35, indicado con una flecha).

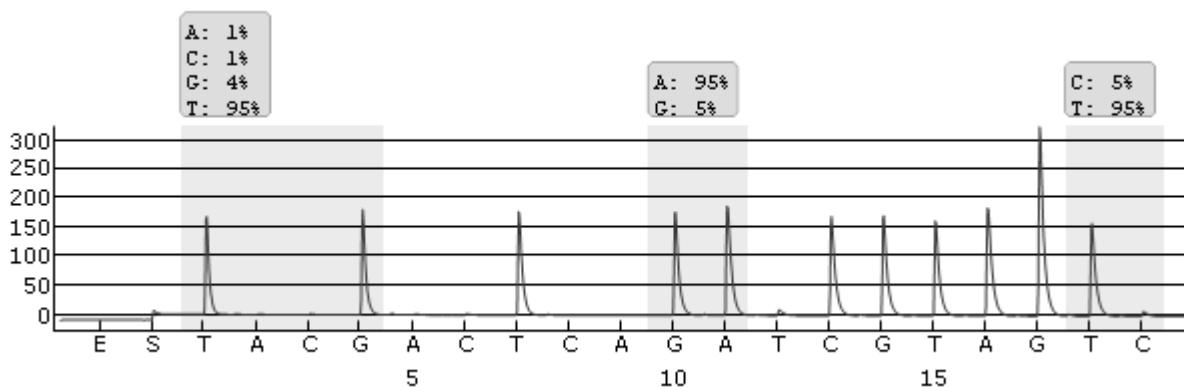




**Figura 8. Pirograma obtenido después del análisis de muestras con una mutación GGT → AGT en la base 1 del codón 12 (nucleótido 34, indicado con una flecha), con la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) GNTGRCGTAGGYA dirigida a la base 2 del codón 12 (nucleótido 35). Un color amarillo indica que esta secuencia es inesperada y necesita comprobarse.**



**Figura 9. Pirograma y resultado obtenidos después del reanálisis de la muestra de la figura 8. La mutación GGT → AGT se reanalizó con la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) NGTGRCGTAGGYA dirigida a la base 1 del codón 12 (nucleótido 34).**



**Figura 10. Pirograma obtenido después del análisis del Mutant KRAS Control DNA con la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) NGTGRCGTAGGYA dirigida a la primera base del codón 12.**

## Guía para la solución de problemas

Esta guía de solución de problemas puede ser útil para resolver cualquier problema que surja. Para obtener más información, consulte también la página «Frequently Asked Questions» (Preguntas frecuentes) en nuestro Centro de Asistencia Técnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Los científicos de los servicios técnicos de QIAGEN contestarán gustosos a cualquier pregunta que usted pueda hacerles sobre la información y los protocolos de este manual, o sobre las tecnologías para muestras y ensayos (para obtener información de contacto, consulte la contraportada o visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**i** Para resolver problemas generales relacionados con el instrumento, consulte el *Manual del usuario del PyroMark Q24*.

### Comentarios y sugerencias

---

#### Señales en el control que no contiene el molde (control negativo)

- a) Contaminación entre pocillos **i** La señal de un pocillo se detecta en un pocillo adyacente. Evite colocar muestras con señales de alta intensidad al lado de pocillos de control que no contienen el molde.
- b) Contaminación de la PCR **i** Utilice puntas de pipeta estériles con filtro. Conserve y extraiga los materiales tales como muestras, plásmidos de control y amplicones separadamente de los reactivos de PCR.

#### Secuencia deficiente o inesperada

- Baja calidad del ADN genómico **i** El ADN genómico de baja calidad puede hacer que falle la PCR. Analice las muestras de PCR empleando una técnica electroforética (utilizando, por ejemplo, el sistema QIAxcel<sup>®</sup> o electroforesis en gel de agarosa).

#### Resultado «Check» (Comprobar) o «Failed» (Fallido)

- Mutación infrecuente no definida en la configuración del ensayo **i** Ajuste la secuencia a analizar en la configuración del ensayo (consulte el apéndice A, página 36) y repita el proceso.

## Comentarios y sugerencias

---

### Fondo alto

Conservación incorrecta de los nucleótidos

ⓘ Conserve los nucleótidos a 2-8 °C. La conservación a -20 °C puede producir un aumento del fondo.

### Ausencia de señales en los controles positivos (wt KRAS Control DNA y Mutant KRAS Control DNA)

a) Mezcla insuficiente de enzima o sustrato para todos los pocillos

ⓘ Asegúrese de rellenar el PyroMark Q24 Cartridge de acuerdo con la «Pre Run Information» (Información previa al proceso) del menú «Tools» (Herramientas).

b) Reactivos conservados o diluidos incorrectamente

ⓘ Prepare los PyroMark Gold Q24 Reagents siguiendo las instrucciones suministradas con los reactivos.

### Pico del trazador inesperado en la última posición variable

Contaminación con ADN del plásmido de control


ⓘ Los plásmidos de control, wt KRAS Control DNA y Mutant KRAS Control DNA, contienen una diferencia de secuencia exclusiva que puede utilizarse para identificar las señales de los controles (consulte «Controles», página 16 y «Apéndice A: Configuración de ensayos PyroMark KRAS», página 36). Utilice puntas de pipeta estériles con filtro. Conserve y extraiga los materiales tales como muestras, plásmidos de control y amplicones separadamente de los reactivos de PCR.

# Apéndice A: Configuración de ensayos PyroMark KRAS


Antes de procesar el PyroMark KRAS por primera vez, el archivo del ensayo debe configurarse de la forma descrita a continuación.

## Procedimiento


### Codones 12 y 13 del KRAS

1. Configure el ensayo de los codones 12 (posición 2) y 13 (posición 2) del KRAS con el PyroMark Q24 MDx Software.
2. Haga clic en el icono  de la barra de herramientas y seleccione «New AQ Assay» (Nuevo ensayo AQ).
3. Introduzca la siguiente secuencia en «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar):

**GNTGRCGTAGGYA**

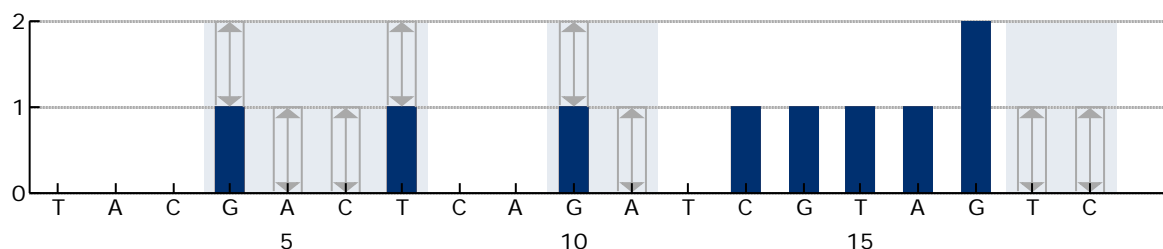
 Las mutaciones más frecuentes del codón 12 se detectarán en el nucleótido 35 (segunda posición). Si hay mutaciones presentes en el nucleótido 34 (primera posición) cambie la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) siguiente secuencia:

**NGTGRCGTAGGYA**

 La posición variable 3 (Y) permite discriminar entre las señales derivadas de los plásmidos de control (wt KRAS Control DNA y Mutant KRAS Control DNA) y las señales del ADN genómico. Mientras que el ADN genómico dará como resultado una C, los plásmidos de control darán como resultado una T en la posición variable 3.

4. Introduzca manualmente la siguiente «Dispensation Order» (Orden de dispensación):

**TACGACTCAGATCGTAGTC**



**Figura 11. Histograma de los codones 12 (nucleótido 35) y 13 (nucleótido 38) con la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) GNTGRCGTAGGYA.**

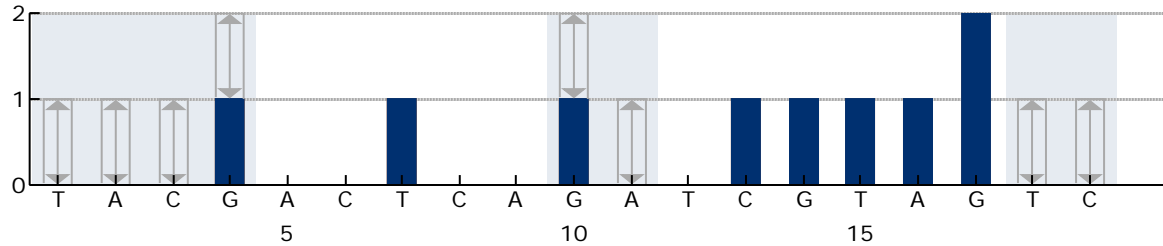





Figura 12. Histograma de los codones 12 (nucleótido 34) y 13 (nucleótido 38) con la «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar) NGTGRCGTAGGYA.

5. Haga clic en la ficha «Analysis Parameters» (Parámetros del análisis) y aumente el «Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:» (Umbral de altura de pico - Altura de pico requerida para la aprobación de la calidad:) a 30.
6. Haga clic en el icono  de la barra de herramientas y guarde el ensayo como *KRAScodon 12+13*.

### Codón 61 del KRAS

7. Haga clic en el icono  de la barra de herramientas y seleccione «New AQ Assay» (Nuevo ensayo AQ).
8. Introduzca la siguiente secuencia en «Sequence to Analyze» (Secuencia a analizar): **CTCDTGACCTRC**

 La posición variable 2 (R) permite discriminar entre las señales derivadas de los plásmidos de control (wt KRAS Control DNA y Mutant KRAS Control DNA) y las señales del ADN genómico. Mientras que el ADN genómico dará como resultado una G, los plásmidos de control darán como resultado una A en la posición variable 2.

9. Añada manualmente el siguiente «Dispensation Order» (Orden de dispensación): **GCTCAGTCAGACTAG**

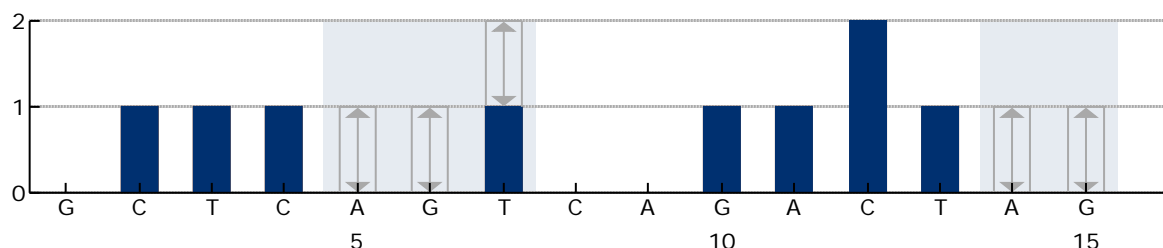




Figura 13. Histograma del codón 61 (nucleótido 183).

10. Haga clic en la ficha «Analysis Parameters» (Parámetros del análisis) y aumente el «Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:» (Umbral de altura de pico - Altura de pico requerida para la aprobación de la calidad:) a 30.
11. Haga clic en el icono  de la barra de herramientas y guarde el ensayo como *KRAScodon 61*.

## Apéndice B: Vaciado del recipiente de residuos y de las cubetas

<p><b>ADVERTENCIA</b></p> 	<p><b>Productos químicos peligrosos</b></p> <p>La solución de desnaturalización empleada con la estación de trabajo de vacío contiene hidróxido sódico, que es irritante para los ojos y la piel.</p> <p>Utilice siempre gafas de seguridad, guantes y una bata de laboratorio.</p> <p>La entidad responsable (p. ej., el encargado del laboratorio) debe tomar las precauciones necesarias para asegurar que el lugar de trabajo circundante sea seguro y que los operadores de los instrumentos no se expongan a niveles peligrosos de sustancias tóxicas (productos químicos o biológicos), tal como se definen en las Material Safety Data Sheets (MSDS) (fichas de datos de seguridad) o en los documentos de la OSHA,* la ACGIH† o el COSHH‡.</p> <p>La evacuación de las emanaciones tóxicas y la eliminación de los residuos deben cumplir toda la normativa nacional, estatal y local de salud y seguridad.</p>
---	--

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

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

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

Asegúrese de que la eliminación de los residuos del laboratorio cumpla la normativa medioambiental federal, estatal y local.

### **Cuestión importante antes de empezar**

- Este protocolo requiere agua de alta pureza (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, [www.millipore.com](http://www.millipore.com), o equivalente).

### **Procedimiento**

- 1. Asegúrese de que no se aplique vacío a la herramienta de vacío. Asegúrese de que el vacío esté cerrado (posición Off [Desactivado]) y de que la bomba de vacío esté apagada.**
- 2. Deseche todos los restos de soluciones que queden en las cubetas.**

3. **Enjuague las cubetas con agua de alta pureza o cámbielas si es necesario.**
4. **Vacíe el recipiente de residuos.**
  - ① La tapa puede retirarse sin desconectar el tubo.
5. **Si es necesario limpiar la estación de trabajo de vacío (por ejemplo, debido a la presencia de polvo o salpicaduras), siga las instrucciones del *Manual del usuario del PyroMark Q24*.**

## Referencias

QIAGEN mantiene en Internet una amplia base de datos actualizada de publicaciones científicas que emplean productos QIAGEN. El completo conjunto de opciones de búsqueda le permitirá encontrar los artículos que necesite, bien mediante una sencilla búsqueda por palabras clave, o bien especificando la aplicación, área de investigación, título, etc.

Si desea consultar una lista completa de referencias, visite la base de datos de referencia en la web de QIAGEN en [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) o póngase en contacto con los servicios técnicos de QIAGEN o con su distribuidor local.

## Información para pedidos

Producto	Índice	N.º de cat.
PyroMark KRAS Kit (24)	Para 24 reacciones en el PyroMark Q24 MDx: cebadores de secuenciación, cebadores de PCR, wt KRAS Control DNA y Mutant KRAS Control DNA	971450
PyroMark Q24 MDx	Plataforma de detección basada en secuencias para el análisis Pyro-sequencing de 24 muestras en paralelo	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Estación de trabajo de vacío (220 V) para preparar 24 muestras en paralelo, desde el producto de PCR hasta el molde monocatenario	9001515* 9001517†
PyroMark Q24 MDx Software	Software de aplicación	9019063
<b>Accesorios</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reacción de secuenciación de 24 pocillos	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para la dispensación de nucleótidos y reactivos	979302
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Para 5 x 24 muestras: mezcla de enzima, mezcla de sustrato y nucleótido	971802
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Para la unión del producto de PCR biotinilado a las micropartículas de sefarosa	979306
PyroMark Denaturation Solution (500 ml)	Para la desnaturalización del producto de PCR bicatenario a ADN molde monocatenario	979307
PyroMark Wash Buffer, concentrate (200 ml)	Para el lavado del ADN monocatenario	979308

\* Para el resto del mundo (aparte del Reino Unido).

† Para el Reino Unido.



<b>Producto</b>	<b>Índice</b>	<b>N.º de cat.</b>
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Para la hibridación del cebador de secuenciación a producto de PCR monocatenario y para la reacción Pyrosequencing	979309
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas de filtro reutilizables para la PyroMark Q96 y Q24 Vacuum Workstation	979010
PyroMark Control Oligo	Para la comprobación de la instalación del sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para la confirmación del rendimiento del sistema	979304
<b>Productos relacionados</b>		
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (250)	Para 250 reacciones de 20 µl: 3 x 0,85 ml de HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix con 250 unidades de HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase en total, 1 x 0,55 ml de CoralLoad® Concentrate y 2 x 1,9 ml de agua sin RNasa	203643
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (1000)	Para 1000 reacciones de 20 µl: 12 x 0,85 ml de HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix con 1000 unidades de HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase en total, 4 x 0,55 ml de CoralLoad Concentrate y 8 x 1,9 ml de agua sin RNasa	203645
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit (2500)	Para 2500 reacciones de 20 µl: 25 ml de HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix con 2500 unidades de HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase en total, 5,5 ml de CoralLoad Concentrate y 2 x 20 ml de agua sin RNasa	203646
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: 50 columnas QIAamp MinElute®, proteinasa K, tampones y tubos de recogida (2 ml)	56404

<b>Producto</b>	<b>Índice</b>	<b>N.º de cat.</b>
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Para 48 preparaciones: cartuchos de reactivos (tejido), puntas desechables con filtro, soportes para puntas desechables, tubos para muestras (2 ml), tubos de elución (1,5 ml), tampón G2 y proteinasa K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparaciones: minicolumnas de centrifugación QIAamp, tampones, reactivos, tubos y VacConnectors	61104

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad de productos específicos, consulte el manual o el manual del usuario del kit QIAGEN correspondiente. Los manuales y los manuales del usuario de los kits QIAGEN están disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems Corporation o sus filiales); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose™ (GE Healthcare); Therascreen® (DxS Limited); Windows® (Microsoft Corporation).

#### **Contrato de licencia limitada**

El uso de este producto implica la aceptación de las siguientes condiciones por parte del comprador o del usuario del PyroMark KRAS Kit:

1. El PyroMark KRAS Kit puede utilizarse únicamente según las instrucciones del *Manual del PyroMark KRAS Kit* y sólo con los componentes incluidos en el kit. En virtud de sus derechos de propiedad intelectual, QIAGEN no otorga ninguna licencia para utilizar o incorporar los componentes incluidos en este kit con componentes no incluidos en este kit, excepto en las condiciones descritas en el *Manual del PyroMark KRAS Kit* y en los protocolos adicionales disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Aparte de las licencias citadas expresamente, QIAGEN no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. La licencia de uso de este kit y sus componentes es para un solo uso, por lo que el kit no puede reutilizarse, restaurarse ni revenderse.
4. QIAGEN desautoriza específicamente cualquier otra licencia, expresa o implícita, aparte de las citadas expresamente.
5. El comprador y el usuario del kit se comprometen a no realizar, ni a permitir realizar a otras personas, acciones que pudieran llevar a actos prohibidos por lo anteriormente expresado, ni a facilitar dichos actos. QIAGEN puede hacer cumplir las prohibiciones de este contrato de licencia limitada en cualquier tribunal, y recuperará todos los costes de investigación y legales, incluidas las costas, incurridos para hacer cumplir este contrato de licencia limitada o cualesquiera de sus derechos de propiedad intelectual relacionados con el kit y/o sus componentes.

Para obtener información actualizada sobre las condiciones de la licencia, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2009 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Alemania** ■ Pedidos 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Servicio técnico 02103-29-12400

**Australia** ■ Pedidos 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Servicio técnico 1-800-243-066

**Austria** ■ Pedidos 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Servicio técnico 0800/28-10-11

**Bélgica** ■ Pedidos 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Servicio técnico 0800-79556

**Brasil** ■ Pedidos 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Servicio técnico 0800-557779

**Canadá** ■ Pedidos 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Servicio técnico 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**China** ■ Pedidos 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Servicio técnico 800-988-0325, 800-988-0327

**Corea (del Sur)** ■ Pedidos 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Servicio técnico 1544 7145

**Dinamarca** ■ Pedidos 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Servicio técnico 80-885942

**EE.UU.** ■ Pedidos 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Servicio técnico 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**España** ■ Pedidos 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Servicio técnico 91-630-7050

**Finlandia** ■ Pedidos 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Servicio técnico 0800-914413

**Francia** ■ Pedidos 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Servicio técnico 01-60-920-930 ■ Ofertas 01-60-920-928

**Hong Kong** ■ Pedidos 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Servicio técnico 800 930 425

**Irlanda** ■ Pedidos 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Servicio técnico 1800 555 061

**Italia** ■ Pedidos 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Servicio técnico 800-787980

**Japón** ■ Teléfono 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Servicio técnico 03-6890-7300

**Luxemburgo** ■ Pedidos 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Servicio técnico 8002-2067

**México** ■ Pedidos 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Servicio técnico 01-800-7742-639

**Noruega** ■ Pedidos 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Servicio técnico 800-18712

**Países Bajos** ■ Pedidos 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Servicio técnico 0800-0229602

**Reino Unido** ■ Pedidos 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Servicio técnico 01293-422-999

**Singapur** ■ Pedidos 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Servicio técnico 65-67775366

**Suecia** ■ Pedidos 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Servicio técnico 020-798328

**Suiza** ■ Pedidos 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Servicio técnico 055-254-22-12

