



CLART® CMA
BRAF·MEK1·AKT1

DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES EN LOS GENES *BRAF*, *MEK1* Y *AKT1*
—PERTENECIENTES A LA RUTA DE MAPK Y ASOCIADOS A MELANOMA—
PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

CLART® CMA BRAF·MEK1·AKT1

CLART®, CLART-Strip®, CAR® y SAICLART® son marcas registradas por GENOMICA.

Para más información, consultar sitio web: www.genomica.com

Marcado CE



GENOMICA, S.A.U.
Parque Empresarial Alvento, Edificio B
Calle Vía de los Poblados, 1 – 1ª planta
28033 Madrid, España
www.genomica.com



Versión 3
Octubre 2016

Contenido

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS	4
2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN.....	5
3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT	8
3.1. Reactivos de amplificación.....	8
3.2. Componentes de visualización.....	8
3.3 Otros componentes.....	9
4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS	10
4.1. Reactivos y material	10
4.2. Equipos.....	10
5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN	11
6. MUESTRAS.....	12
7. PROTOCOLO DE TRABAJO	12
7.1. Pre-tratamiento de la muestra.....	12
7.2. Extracción de DNA.....	13
7.2.1. Recomendaciones específicas para la extracción	13
7.2.2. Protocolo de Extracción.....	14
7.3. Reacción de Amplificación	15
7.3.1. Recomendaciones específicas para la amplificación.....	15
7.3.2. Protocolo de Amplificación	16
7.4. Visualización del producto amplificado	17
7.4.1. Recomendaciones específicas para la visualización	17
7.4.2. Protocolo de visualización	18
8. RESULTADOS	21
9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL KIT.....	21
9.1. Parámetros de procesamiento.....	21
Sensibilidad analítica	21
Especificidad Analítica	22
9.2. Parámetros de utilidad diagnóstica	22
Sensibilidad diagnóstica	23
Especificidad diagnóstica.....	24
Repetibilidad y Reproducibilidad diagnóstica	24
10. Control de interferencias conocidas	26
11. REFERENCIAS	26

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS



Atención, ver instrucciones de uso



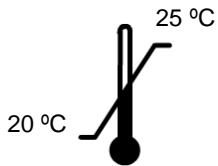
Fecha de caducidad



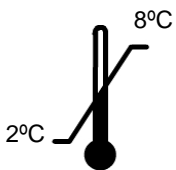
Producto sanitario para Diagnóstico *In Vitro*



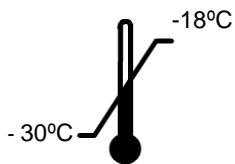
Lote



Conservar a temperatura ambiente



Conservar entre 2 °C y 8 °C



Conservar entre -30 °C y -18 °C

2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN

CLART® CMA BRAF-MEK1-AKT1 detecta mutaciones puntuales en los genes **BRAF**, **MEK1** y **AKT1**. Los productos de estos genes son miembros de la ruta de señalización de MAPK (**BRAF/MEK/ERK**), implicada en la proliferación celular e inhibición de la apoptosis asociada con melanoma.

CLART® CMA BRAF-MEK1-AKT1 se ofrece en dos formatos de análisis, **CLART® BRAF** y **CLART® BRAF, MEK1 y AKT1**, cada uno de los cuales permite detectar las siguientes mutaciones:

- **CLART® BRAF:**

GEN	EXÓN	CODON	NUCLEÓTIDO
BRAF	Exón 15	V600E	c.1799T>A
	Exón 15	V600K	c.1799delGT>insAA

Tabla 1

- **CLART® BRAF, MEK1 & AKT1:**

GEN	EXÓN	CODON	NUCLEÓTIDO
BRAF	Exón 15	V600E	c.1799T>A
	Exón 15	V600K	c.1799delGT>insAA
MEK1	Exón 3	I111S	c.332T>G
	Exón 3	P124S	c.370C>T
	Exón 6	E203K	c.607G>A
AKT1	Exón 3	Q79K	c.235C>A

Tabla 2

El material de partida para ambos formatos es DNA extraído de biopsias de melanoma, en forma de tejido tumoral fijado con formalina y embebido en parafina.

La detección está basada en nuestra tecnología CLART®: Una amplificación PCR multiplex a tiempo final, seguida de visualización en microarray de baja densidad.

En la Figura 1 se muestra un CLART-Strip® (CS), cada uno de cuyos pocillos contiene todas las sondas específicas para la caracterización de una muestra.

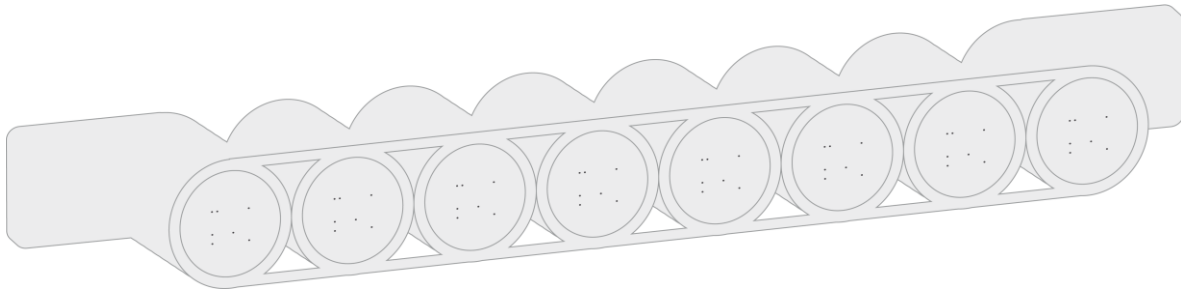


Figura 1. CLART-Strip® en forma de tira de 8 pocillos.

La Figura 2 muestra un esquema del sistema de detección. Básicamente, los productos amplificados por PCR, y marcados con biotina, hibridan con sus sondas complementarias específicas, inmovilizadas en áreas bien definidas del microarray. A continuación, tienen lugar dos pasos de incubación secuencial: primero, con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, y segundo, con un sustrato de o-dianisidina.

Seguidamente, aparece un precipitado en aquellas regiones del microarray donde ha tenido lugar la hibridación específica entre los productos de amplificación y sus sondas específicas.

Finalmente tiene lugar el análisis e interpretación automática de resultados, gracias al lector CAR® (CLINICAL ARRAY READER), en el cual se emplean softwares diseñados y validados por GENOMICA.

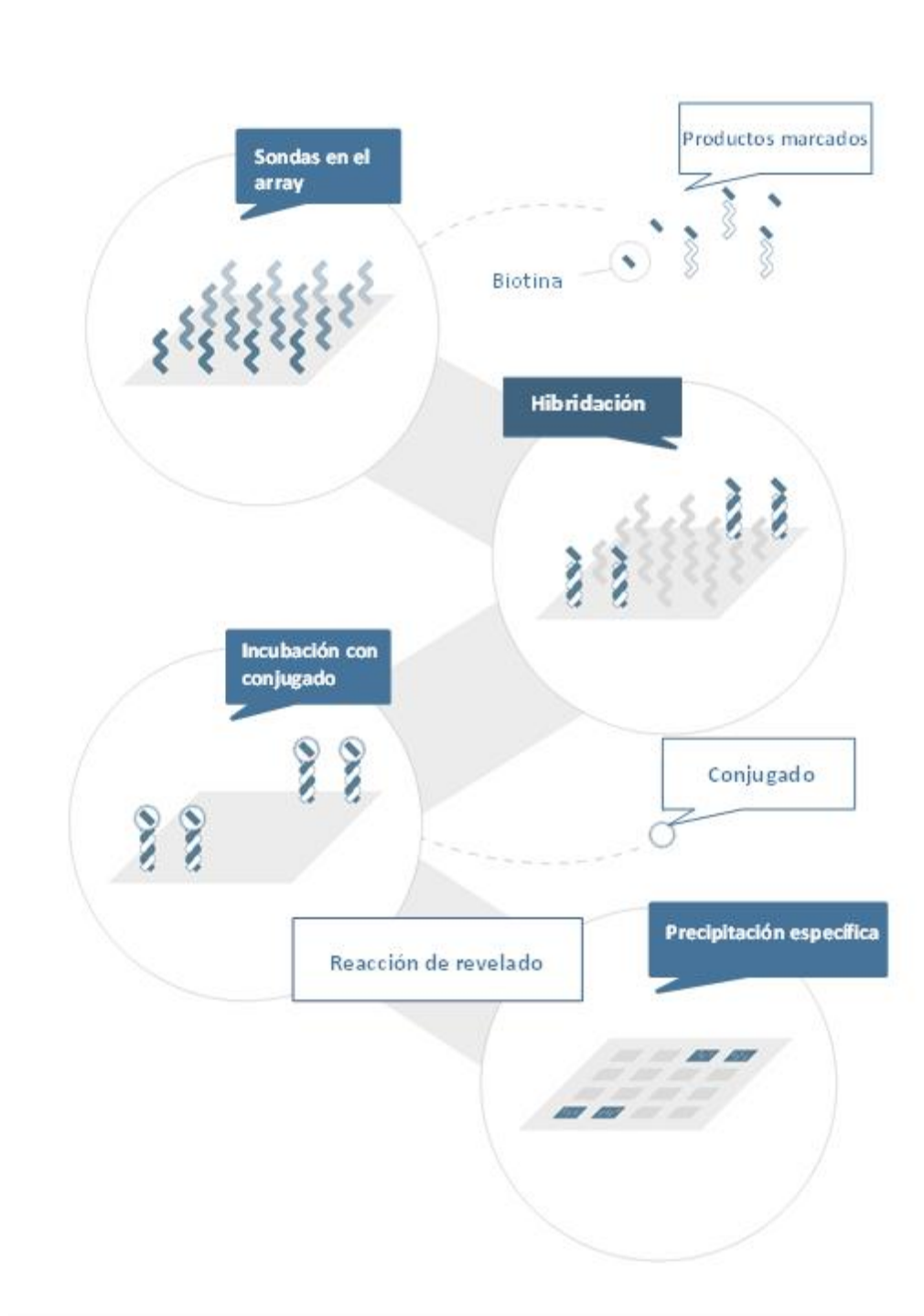


Figura 2. Esquema del Sistema de detección. Las sondas inmovilizadas en la superficie del microarray capturan sus respectivos productos de amplificación complementarios, marcados con biotina. A continuación tiene lugar la unión de la biotina con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguida de una incubación con o-dianisidina, sustrato de la peroxidasa. Esto genera un precipitado en el área donde ha tenido lugar la hibridación.

3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT

Cada uno de los componentes del kit se envía a su temperatura óptima de almacenamiento, y permanecerá estable hasta la fecha de caducidad, siempre y cuando se respeten las recomendaciones de conservación.

A continuación se indican los componentes del kit:

3.1. Reactivos de amplificación

Envío y almacenaje a -20°C.

Los tubos de amplificación se envían listos para su uso. Cada tubo de amplificación contiene 45 µL de mezcla de reacción. Sólo se debe descongelar el número exacto de tubos que se vaya a emplear. Los tubos restantes deben mantenerse a -20°C.

El formato **CLART[®] BRAF** incluye 2 tipos de tubos de amplificación:

Mix 1: Tubo blanco

Mix 2: Tubo azul

El formato **CLART[®] BRAF, MEK1 & AKT1** incluye 3 tipos de tubos de amplificación:

Mix 1: Tubo blanco

Mix 2: Tubo azul

Mix 3: Tubo rojo

Es obligatorio amplificar cada muestra con todos los tubos de amplificación del formato correspondiente (Tubos blanco y azul, del formato **CLART[®] BRAF; Tubos blanco, azul y rojo del formato **CLART[®] BRAF, MEK1 & AKT1**). De no ser así, no se obtendrán resultados valorables.**

Nota: Las cajas de tubos de amplificación incluyen un indicador adhesivo e irreversible de temperatura; la aparición de un color rojizo en la ventana de visualización indica que en algún momento los productos han sobrepasado la temperatura de conservación de -20°C y no deben utilizarse.

3.2. Componentes de visualización

Los componentes de visualización se dividen en dos grupos, en base a las condiciones óptimas de envío y conservación:

- Envío y almacenaje a temperatura ambiente:

- **CLART-Strip® (CS)**, cada uno de cuyos pocillos contiene todas las sondas específicas para la detección de las mutaciones incluidas en el kit.

Nota: Las unidades de **CS** se envían en un sobre termosellado que ha de mantenerse cerrado y protegido de la luz y las altas temperaturas (25°C máximo), hasta el momento de su uso.

- **SH** (Solución de Hibridación).
- **Adaptador de placa Microtiter y tapa de plástico.**

- Envío y almacenaje a 4°C:

- **DC** (Diluyente de Conjugado).
- **CJ** (Solución de Conjugado).
- **RE** (Solución de Revelado).
- **TL** (Tampón de Lavado).

3.3 Otros componentes

- Lector **CAR®** de GENOMICA.
Garantiza la lectura, análisis e interpretación automática de resultados de hasta 12 **CS** (96 muestras) por ensayo. Despliega una interfaz gráfica de fácil utilización (CLEIS), e incluye el software de procesamiento de imagen SAICLART® propiedad de GENOMICA, así como Softwares específicos para cada kit.

Nota: El uso del CAR® es exclusivo para kits de diagnóstico de GENOMICA.



Figura 3. CAR® (CLINICAL ARRAY READER)

4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS

A continuación se proporciona una lista de todos los componentes requeridos y no suministrados:

4.1. Reactivos y material

- Agua destilada.
- Guantes desechables.
- Puntas con filtro o pipetas con desplazamiento positivo.
- Recipiente con hielo picado o “Cooler”.
- Tubos Eppendorf autoclavados de 1.5 mL.
- Gradillas para tubos de 1.5 mL.
- Soporte para tubos de 0.5 mL/0.2 mL.
- Kit “QiAmp DNA FFPE Tissue” de Qiagen.

4.2. Equipos

- Microcentrífuga.
- Espectrofotómetro de UV-visible (Nanodrop).
- Termociclador. Se recomienda el uso del termociclador convencional “*Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler*”. En caso de usar termocicladores de rampas rápidas, se recomienda el uso del termociclador “*Mastercycler Nexus Gradient*” de Eppendorf. En todos los casos será obligatorio verificar el termociclador del modo que se explica en la sección 6.3.1 del presente manual.
- Cabina de seguridad biológica para el área de pre-PCR.
- Tres micropipetas ajustables en los rangos 1-20 µL, 20-200 µL, y 200-1000 µL para el área de pre-PCR.
- Una micropipeta ajustable en el rango 1-20 µl, para añadir el material genético a los tubos de amplificación.
- Tres micropipetas ajustables en los rangos 1-20 µL, 20-200 µL, y 200-1000 µL para el área de post-PCR.
- Termobloque (Thermomixer) compatible con placas de amplificación de 96 pocillos con faldón y agitación, ajustable a 20°C, 25°C y 50°C.
- Vórtex.
- Bomba de vacío.

5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

Léase detenidamente para evitar contaminaciones.

1. La técnica CLART® CMA BRAF-MEK1-AKT1 ha de ser llevada a cabo en dos áreas separadas físicamente, con el fin de minimizar contaminaciones de la muestra:

Área de Pre-PCR: En éste área tiene lugar la extracción de DNA y la preparación de la muestra. La manipulación de la muestra ha de llevarse a cabo en el interior de una cabina de seguridad biológica.

Área de Post-PCR: En éste área tiene lugar la amplificación y visualización del producto de amplificación. Se ha de evitar que el material del área de Post-PCR entre en contacto con el del área de Pre-PCR, por lo que se recomienda no entrar en el área de Pre-PCR tras trabajar en Post-PCR.

Cada área ha de disponer de su propio material independiente (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc.), el cual nunca debe sacarse de dicho área.

2. Use guantes en todo momento. Es recomendable cambiar a menudo de guantes, y obligatorio hacerlo (i) antes de empezar a trabajar en cada una de las áreas anteriormente mencionadas, y (ii) antes de añadir DNA a los tubos de amplificación.

3. Manipule el xileno siempre en el interior de una campana de gases, siendo obligatorio el uso de un equipamiento de protección personal como guantes y mascarilla. Deben aplicarse las recomendaciones para almacenaje de sustancias inflamables. Los restos de xileno generados han de ser tratados como material de desecho no halogenado.

4. Limpie en profundidad las áreas de trabajo empleadas (poyata, campanas, gradillas, pipetas), con lejía diluida al 10%, **después de procesar cada tanda de muestras**. Es obligatorio descontaminar todas las áreas de trabajo en caso de producirse una contaminación. Asimismo, se recomienda limpiar termocicladores y termomixers antes y después de cada uso, siguiendo el mismo procedimiento.

5. Use puntas con filtro o pipetas de desplazamiento positivo para evitar contaminaciones. Emplee juegos de pipetas diferentes para cada área. Y descarte la punta de la micropipeta después de cada uso.

6. Use material de laboratorio desechable y autoclavado.

7. No deben mezclarse reactivos de viales diferentes, incluso aunque pertenezcan al mismo lote.

8. Cierre los tubos de reactivos después de su uso, con el fin de evitar contaminaciones.

6. MUESTRAS

El kit **CLART[®]CMA BRAF-MEK1-AKT1** ha sido diseñado y validado para el análisis de DNA extraído de biopsias de melanoma, en forma de tejido tumoral fijado en formalina y embebido en parafina.

GENOMICA no garantiza la fiabilidad de los resultados para un tipo de muestra diferente a ese.

7. PROTOCOLO DE TRABAJO

El kit **CLART[®] CMA BRAF-MEK1-AKT1** ha sido validado empleando el protocolo que se muestra más abajo, el cual constituye el Protocolo de Trabajo.

Se recomienda prestar especial atención a las recomendaciones de las secciones 5, 7.2.1, 7.3.1. y 7.4.1 del presente manual, para obtener un resultado satisfactorio de la técnica.

7.1. Pre-tratamiento de la muestra

Procesamiento previo

El tejido ha de ser fijado en formol neutro tamponado al 10%, en el plazo máximo de 1 hora tras la obtención de la muestra. La muestra ha de mantenerse a temperatura ambiente, no debiendo emplearse fijadores basados en alcohol o mercurio. El tiempo óptimo de fijación es de 8-24 horas para muestras quirúrgicas grandes y de 6-12 horas para muestras pequeñas.

Seguidamente las muestras deben incluirse en bloques de parafina. Los bloques que contienen las muestras han de ser cortados y colocados en un portaobjetos de vidrio para su exploración por parte del patólogo. Cada muestra debe procesarse con un bisturí estéril nuevo.

El análisis de cada muestra por parte del patólogo incluye la tinción con hematoxilina y eosina. La tinción ha de aplicarse inmediatamente antes de realizar los cortes de a usar en el estudio molecular. La tinción permitirá definir y delimitar el área tumoral, que vendrá caracterizada como porcentaje (%) de células tumorales. Se recomienda que el porcentaje de células tumorales represente al menos un 20% de la muestra para que los resultados sean valorables.

El número de cortes de parafina a emplear para la extracción vendrá condicionado por el tamaño de la biopsia y el número de células tumorales presentes en cada sección. Se recomienda seleccionar los fragmentos de mayor celularidad y evitar áreas necrosadas o

de células *no tumorales* Para más información, consultar las directrices nacionales de oncología médica.

Desparafinación

Una vez delimitada la zona tumoral de la muestra, se procederá a la desparafinación. Este proceso puede llevarse a cabo colocando los cortes de parafina bien en un portaobjetos (porta) de vidrio, o bien en el interior de un tubo. Los protocolos correspondientes se muestran a continuación.

• **Cortes de parafina en portaobjetos de vidrio:**

1. Sumergir el porta en una cubeta llena de xileno durante 5 minutos.
2. Sumergir el porta en una cubeta llena de etanol al 96% durante 5 minutos.
3. Sumergir el porta en una cubeta llena de etanol fresco al 96%, retirar el cubre y rascar la superficie del porta con una cuchilla, cuando el porta esté aún húmedo. Recoger la muestra e introducirla en un tubo Eppendorf.
4. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad. Descartar el sobrenadante.
5. Centrifugar 2 minutos a máxima velocidad. Descartar el sobrenadante. Dejar secar el etanol al aire.
6. Continuar con la extracción de DNA.

Cortes en rollos de parafina:

1. Descartar del bloque tanta parafina como sea posible, antes de preparar los cortes.
2. Colocar los rollos de parafina para la extracción de DNA, dentro de un tubo de 1.5 ml.
3. Añadir 500 μ l de aceite mineral directamente sobre la muestra, verificando que los cortes quedan totalmente cubiertos por el aceite.
4. Incubar la muestra a 95°C con agitación (550 rpm) durante 2 minutos, con la ayuda de un Thermomixer.
5. Centrifugar a 8000rpm durante 2 minutos.
6. Aspirar todo el aceite con cuidado, evitando tocar la muestra.
7. Repetir los pasos 3 a 6.
8. Añadir el tampón de lisis asegurando que queda cubierta toda la muestra, y continuar con la extracción de DNA.

7.2. Extracción de DNA

7.2.1. Recomendaciones específicas para la extracción

1. Limpiar las superficies de trabajo de la cabina de seguridad biológica con lejía diluida al 10%.

2. Conectar el flujo laminar al menos 20 minutos antes de comenzar la extracción.
3. La preparación de la muestra previa a la extracción ha de ser llevada a cabo en el interior de la cabina de seguridad biológica.

7.2.2. Protocolo de Extracción

Para la extracción de DNA se recomienda especialmente el uso del kit “QiAmp DNA FFPE Tissue” de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de elución debe ser de 50 μ l. No obstante, se podrían emplear métodos de extracción de DNA alternativos siempre y cuando garanticen la obtención de parámetros de concentración y pureza equivalentes (ver más abajo).

1. **La cantidad de material genético a añadir a cada tubo de PCR será de 150 ng.** En consecuencia, la cantidad total de DNA necesaria variará en función del formato:
 - Formato **CLART® BRAF** (2 tubos): 300 ng de DNA total;
 - Formato **CLART® BRAF, MEK1 y AKT1** (3 tubos): 450 ng de DNA total.
 Cantidades de DNA diferentes a estas, tanto por exceso como por defecto, pueden conducir a un diagnóstico erróneo.
2. Es recomendable trabajar con una concentración de DNA de 30 ng/ μ l (5 μ l por tubo de PCR para un total de 150 ng). Se pueden utilizar también otras concentraciones de DNA, teniendo en cuenta que el volumen máximo que se puede añadir a cada tubo de PCR es de 10 μ l. Por tanto, si la concentración de DNA es inferior a 15 ng/ μ l, debería repetirse la extracción de la muestra.

Estos puntos se resumen a continuación en la Tabla 3.

Formato CLART® BRAF		
TUBOS	DNA total (ng) por tubo	Volumen máximo (μl) por tubo
Mix1: blanco	150 ng	10 μ l
Mix2: azul	150 ng	10 μ l
Formato CLART® BRAF, MEK1 & AKT1		
TUBOS	DNA total (ng) por tubo	Volumen máximo (μl) por tubo
Mix1: blanco	150 ng	10 μ l
Mix2: azul	150 ng	10 μ l
Mix3: rojo	150 ng	10 μ l

Tabla 3

3. El DNA extraído debe cumplir con ciertos requisitos básicos de pureza para evitar un diagnóstico erróneo. El ratio entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm

debería aproximarse a 2 lo más posible. Si la pureza no fuera la correcta, habría que extraer de nuevo la muestra.

4. Almacenar el DNA a 4°C para su procesamiento inmediato, o a -20°C si se va a procesar más tarde.
5. Es fundamental incluir un control negativo en cada carrera, para comprobar si las muestras han sufrido alguna contaminación en alguno de los pasos de extracción, amplificación o visualización, en cuyo caso se obtendría un resultado falso positivo.

7.3. Reacción de Amplificación

7.3.1. Recomendaciones específicas para la amplificación

- Trabajar en el área de pre-PCR, siempre en el interior de una cabina con flujo laminar y siguiendo las recomendaciones de la Sección 5.
 - **Mantener los tubos de amplificación a 4°C a lo largo de todo el proceso de preparación** (en particular, durante la adición del DNA extraído y hasta el momento de ser introducidos en el termociclador para la amplificación por PCR).
 - **No colocar los tubos de amplificación en el termociclador hasta el momento en que éste haya alcanzado 95°C.** Se trata de una medida de prevención frente a amplificaciones inespecíficas resultantes de incubar a temperaturas inferiores a la temperatura de hibridación.
 - Es recomendable verificar el termociclador de forma periódica.
- Se recomienda el uso de un termociclador convencional, y comprobar los tiempos de enfriamiento y calentamiento, para ratificar su correlación con los parámetros de la Tabla 4:

Temperatura (°C)	Tiempo (Segundos)
95°C → 94°C	0.1
94°C → 66°C	23.7
66°C → 94°C	27.8
66°C → 72°C	10.8

Tabla 4. Variaciones de temperatura y tiempos correspondientes más adecuados para un termociclador convencional.

- En caso de usar un termociclador de rampa rápida, será necesario ajustar las rampas para cumplir con los parámetros de la Tabla 5:

Temperaturas (°C)	Tiempo (Segundos)	°C/sec
95°C → 94°C	0.1	NA*
94°C → 66°C	23.7	1.18
66°C → 94°C	27.8	1
66°C → 72°C	10.8	NA

*NA: no aplicable.

Tabla 5. Variaciones de temperatura y tiempos correspondientes más adecuados para un termociclador de rampa rápida. La tercera columna recoge los °C/Segundo para cada fase del programa de PCR.

7.3.2. Protocolo de Amplificación

1. Descongelar en hielo el número de tubos de amplificación necesario según el número de muestras y genes a analizar. Mantener a 4°C.
2. Centrifugar brevemente los tubos de amplificación para trasladar todo el líquido al fondo del tubo (en caso de no disponer de adaptadores de microcentrífuga para tubo, se pueden sustituir por tubos más grandes a los que se haya cortado la tapa).
3. Una vez comprobada la concentración y pureza del DNA extraído, añadir a cada tubo de amplificación 5 µL del mismo (o el volumen necesario según las indicaciones de la Sección 7.2.2). Resuspender varias veces con la micropipeta. Mantener los tubos a 4°C.
4. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	95°C	15'
40 ciclos	94°C	60"
	66°C	60"
1 ciclo	72°C	10'
1 ciclo	4°C	Hasta retirada del tubo

5. Iniciar el programa y colocar los tubos en el termociclador cuando el bloque haya alcanzado 95°C.

El producto de amplificación debe conservarse a 4°C y ser visualizado **en un máximo de 5 días** para evitar su degradación.

7.4. Visualización del producto amplificado

7.4.1. Recomendaciones específicas para la visualización

1. La visualización ha de llevarse a cabo siempre en el área de post-PCR. No introducir nunca de nuevo el producto amplificado en el área de pre-PCR.
2. Encender el CAR® antes de iniciar todo el proceso. La auto-calibración del equipo puede durar unos minutos. El dispositivo debería estar listo en el momento de la lectura para evitar una espera innecesaria y una exposición excesiva a la solución de revelado.
3. Antes de comenzar el ensayo es recomendable verificar el thermomixer a las temperaturas en que va a ser utilizado, 20 °C, 25 °C y 50 °C, por medio de una sonda termopar en contacto directo con la placa del thermomixer.
4. Asegurarse de que antes de comenzar la hibridación, el thermomixer ha estado a 50°C durante al menos 60 minutos.
5. SH cristaliza a temperatura ambiente, por lo que antes de su uso ha de calentarse a 50°C durante al menos media hora y no más de una hora. La SH debe ser homogénea.
6. No añadir SH a los pocillos del **CS** hasta que la desnaturalización haya concluido.
7. Preparar TL diluido (Solución de Lavado) inmediatamente antes de su uso; no reutilizar soluciones preparadas con anterioridad.
8. Limpiar el termociclador con solución de lejía diluida al 10% antes de poner en marcha el programa de desnaturalización. El tiempo de desnaturalización ha de ser exactamente de 8 minutos.
9. Durante la preparación de las muestras para la visualización, han de usarse puntas diferentes para cada pocillo y cambiarse cada vez que se añada un reactivo, incluso cuando se trate de TL.
10. El producto de amplificación solo debe desnaturalizarse una vez para la visualización. En caso de que se necesite repetir el proceso de visualización, se recomienda hacer alícuotas del producto de amplificación previamente al paso de desnaturalización.
11. Usar siempre puntas con filtro para la adición de los productos de amplificación a los pocillos del **CS**.

12. Emplear bombas de vacío para aspirar las soluciones, y descontaminar con una solución de lejía diluida al 10% tras cada ensayo. Asegurarse de que la bomba aspira adecuadamente y no deja restos en el fondo del pocillo.
13. Tras la incubación con Solución CJ diluida, es esencial lavar en profundidad y rápidamente los pocillos del **CS**, para evitar que queden residuos que podrían ocasionar una precipitación inespecífica tras reacción con RE.
14. Aspirar completamente las diferentes soluciones de los pocillos del **CS** sin tocar el fondo del mismo con la punta. De lo contrario, podrían dañarse las sondas.
15. No dejar secar el pocillo totalmente.
16. Dispensar todas las soluciones en la pared del pocillo del **CS**; nunca directamente sobre el fondo del mismo.
17. Evitar generar espuma al añadir reactivos.
18. Al visualizar la imagen en el CAR®, comprobar que aparecen los marcadores de posición y que no hay burbujas, fibras o manchas que interfieran en la lectura. En caso contrario, limpiar el fondo exterior del pocillo con un papel de celulosa.

7.4.2. Protocolo de visualización

1. Desnaturalización de los productos de amplificación: Colocar los tubos de amplificación en el termociclador, e incubar a 95°C **durante 8 minutos exactos**. A continuación, sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo o a 4°C.
2. Preparación de Solución de Lavado: Para cada **CS** que se vaya a procesar, preparar 10 mL de solución de lavado, diluyendo 1 mL de TL en 9 mL de agua destilada.
3. Prelavado de los **CS**: Colocar los **CS** necesarios en el adaptador de placa microtiter. Añadir 200 µL de solución de lavado a cada pocillo antes de usarlo. Resuspender 10-15 veces con la pipeta multicanal. Se recomienda realizar este lavado mientras tiene lugar la desnaturalización de los productos de amplificación.
4. Hibridación:

ADVERTENCIA: No añadir SH hasta que no se hayan sacado los tubos de desnaturalizar. Si se añade antes puede suceder que disminuya la temperatura de la SH pudiendo dar lugar a una bajada de intensidad de las sondas y a la aparición de falsos negativos.

Una vez desnaturalizados los productos amplificados, retirar la solución de lavado de los pocillos con una bomba de vacío. Inmediatamente, añadir a cada pocillo 100 μ L de SH precalentado a 50°C, evitando generar espuma.

Nota: Los pocillos deben quedar totalmente libres de residuos de solución de lavado, aunque nunca deben secarse completamente por lo que inmediatamente se ha de añadir la SH.

Añadir 5 μ L de producto amplificado desnaturalizado de cada Mix correspondiente a una misma muestra/ paciente **al mismo pocillo del CS**. Los volúmenes a añadir dependerán del formato usado, y se detallan a continuación:

Formato CLART[®] BRAF: 5 μ L de Mix 1 (Tubo blanco) + 5 μ L de Mix 2 (Tubo azul)

Formato CLART[®] BRAF, MEK1 & AKT1: 5 μ L de Mix 1 (Tubo blanco) + 5 μ L de Mix 2 (Tubo azul) + 5 μ L de Mix 3 (Tubo rojo)

Resuspender la solución varias veces, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. Cubrir el adaptador de placa microtiter y los **CSs** con la tapa de plástico, e incubar en el thermomixer durante 1 hora a 50°C, y 550 rpm.

Después de la incubación, retirar los **CSs** del thermomixer y aspirar la solución de incubación de los pocillos del CS con una bomba de vacío.

Programar el thermomixer a 20°C y con agitación a 550 rpm, para su uso posterior en el paso 5 de más abajo.

Doble lavado: Añadir 200 μ L de Solución de Lavado a cada pocillo, resuspendiendo de 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar la solución de lavado con una bomba de vacío, procurando retirar el mayor volumen posible de reactivo. Repetir. En este paso se han de emplear diferentes puntas para cada pocillo y lavado. Mantener las muestras en la solución de lavado hasta que el thermomixer alcance 20°C.

5. Bloqueo y conjugado: Centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación preparar la Solución CJ diluida. Para ello añadir **15 μ L de CJ en 1 mL de DC** (cantidades adecuadas para un **CS**), al menos 5 minutos antes de finalizar la etapa de hibridación.

Aspirar la Solución de Lavado de los pocillos sin dejar ningún resto, y añadir **100 μ L** de Solución CJ diluida a cada pocillo. Incubar durante **30 minutos exactos en el thermomixer a 20°C y 550 rpm**. Tras esta incubación, sacar la placa y retirar la solución rápidamente con bomba de vacío. Dejar programado el thermomixer a 25°C

sin agitación para su utilización posterior en el paso 8.

6. Triple lavado: Inmediatamente después del paso 5, añadir 200 μL de Solución de Lavado a cada pocillo, resuspendiendo 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar la Solución de Lavado con una bomba de vacío procurando eliminar el mayor volumen posible. Repetir la operación **dos veces más**.

Es **muy importante** que no queden restos de Solución CJ diluida en los pocillos, ya que ésta podría reaccionar con la solución RE dando lugar a una señal inespecífica.

7. Revelado: Eliminar por completo la Solución de Lavado de los pocillos. A continuación, añadir **100 μL** de RE a cada pocillo e incubar durante **10 minutos a 25°C** en el thermomixer **sin agitación**.
8. Retirar completamente la solución RE usando una bomba de vacío. Los pocillos deben quedar totalmente secos para la lectura.
9. Lectura: Colocar el adaptador de placa microtiter junto con el/ los CS/s a analizar en la bandeja del CAR[®]. El CAR[®] automáticamente llevará a cabo la lectura y emitirá un informe de resultados.

8. RESULTADOS

El análisis de resultados y la emisión del informe correspondiente serán llevados a cabo de manera automática por el CAR®.

Controles incluidos en ambos formatos de kit:

- **Control de extracción de DNA genómico.** Confirma la presencia de DNA del paciente en la muestra, confirmando así la validez de resultados negativos.
- **Control interno de amplificación.** Chequea la eficacia de la reacción de amplificación por PCR, permitiendo distinguir entre resultados negativos reales y aquellos que resultan de una inhibición de la reacción de PCR.

El informe mostrará los resultados del ensayo, junto con el nombre del gen o genes que se han analizado:

- Formato *BRAF*: “*BRAF* Analizado”
- Formato *BRAF, MEK1 & AKT1*: “*BRAF-MEK1-AKT1* Analizados”

En la Tabla 6, a continuación, se recogen los posibles resultados a obtener, así como las explicaciones y soluciones correspondientes:

Resultado	Explicación	Solución: Repetir...
NO DNA	Extracción no válida debido a la presencia de inhibidores, a un fallo durante la extracción del DNA, o a la degradación de la muestra	...proceso completo
PCR INHIBIDA	Extracción de DNA correcta, pero amplificación no válida	...amplificación y etapas subsiguientes
NO-CONCLUYENTE	<ul style="list-style-type: none">• Resultados muy diferentes obtenidos con sondas idénticas en un mismo pocillo del CS, o• Más de dos mutaciones positivas en el mismo gen, debido a un fallo en la reacción de PCR	...amplificación y etapas subsiguientes
NO VÁLIDO	Baja señal de la imagen	... visualización

9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL KIT

9.1. Parámetros de procesamiento

Sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica se determina mediante amplificación de diluciones seriadas de DNA de plásmidos recombinantes. Cada uno de los plásmidos lleva como inserto uno de los fragmentos de amplificación correspondientes a una de las 6 mutaciones detectadas por el kit. El fragmento de amplificación incluye la secuencia complementaria a la sonda de detección correspondiente.

De manera adicional, se ha determinado la sensibilidad analítica de las mutaciones de BRAF, mediante la amplificación de diluciones seriadas de líneas celulares comerciales que contienen las mutaciones detectadas por el kit.

Las Tablas 7 y 8, a continuación, reflejan los resultados obtenidos tras la visualización:

Mutaciones puntuales	Número de copias del clon por reacción de PCR	Sensibilidad (clones) (%)	Cantidad de DNA (Línea celular)	Sensibilidad (Línea celular) (%)
BRAF				
V600K	10000	100%	5 ng	100%
	1000	60%	2 ng	20%
V600E	1000	100%	0.5 ng	100%
	100	80%	0.2 ng	80%

Tabla 7

Mutaciones puntuales	Número de copias del clon por reacción de PCR	Sensibilidad (clones) (%)
MEK1		
I111S	10000	100%
	1000	40%
P124S	10000	100%
	1000	20%
E203K	10000	100%
	1000	80%
AKT1		
Q79K	10000	100%
	1000	60%

Tabla 8

Especificidad Analítica.

La especificidad se determinó mediante la amplificación de diluciones seriadas de DNA de plásmidos recombinantes, cada uno de los cuales lleva como inserto uno de los fragmentos de amplificación correspondientes a las mutaciones detectadas por el kit, o bien al gen *wild type* correspondiente. En ningún caso se ha observado detección inespecífica. Por tanto, se considera que la técnica alcanza una especificidad analítica del 100%.

9.2. Parámetros de utilidad diagnóstica

Con el fin de determinar los parámetros diagnósticos del kit, se llevó a cabo una evaluación comparativa de la técnica **CLART® CMA BRAF-MEK1-AKT1** frente a la técnica de referencia (secuenciación por Sanger). Para esta evaluación se contó con la colaboración del hospital de referencia: Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, España.

Para cada muestra se asume como verdadero el resultado concordante entre ambas técnicas. En el caso de existir discrepancias, se considera verdadero el resultado de la secuenciación por Sanger.

Sensibilidad diagnóstica

Para el estudio de sensibilidad diagnóstica se testaron 155 muestras en total. Los resultados se muestran en la tabla 9, a continuación:

N:155	Sensibilidad (%)	VPP (%)
BRAF V600E (94)	100%	98,94%
BRAF V600K (15)	93,33%	100%
MEK I111S (0)	NV	NV
MEK P124S (1)	NV	NV
MEK E203K (1)	NV	NV
AKT Q79K (0)	NV	NV

Tabla 9

N: Número de muestras analizadas

Entre paréntesis se indica el número de muestras positivas analizadas para cada mutación

NV: No valorable (resultado no significativo)

VPP: Valor Predictivo Positivo

La sensibilidad obtenida con el formato **CLART® BRAF** fue superior al 93% para todas las mutaciones.

La sensibilidad obtenida con el formato **CLART® BRAF-MEK1-AKT1** también fue superior al 93% para todas las mutaciones de BRAF. En el caso de las mutaciones de MEK1 y AKT1, el resultado se muestra como “NV, No valorable”, debido al reducido número de muestras analizadas (en línea con la baja prevalencia de estas mutaciones).

Se analizó una muestra positiva para la mutación MEK1 E203K, y una muestra positiva para MEK1 P124S, con el formato **CLART® CMA BRAF-MEK1-AKT1**. La primera se detectó correctamente con el kit, mientras que la segunda se encontraba en el límite de detección y no fue detectada.

Especificidad diagnóstica

La especificidad diagnóstica de *CLART® CMA BRAF-MEK1-AKT1* fue determinada por medio del análisis de las muestras que se muestran en la Tabla 10, a continuación:

N:155	Especificidad (%)	VPN (%)
BRAF V600E (60)	98,33%	100%
BRAF V600K (139)	100%	99%
MEK I111S (151)	100%	100%
MEK P124S (151)	100%	99%
MEK E203K (150)	100%	100%
AKT Q79K (153)	100%	100%

Tabla 10

N: Número de muestras analizadas

Entre paréntesis se indica el número de muestras positivas analizadas para cada mutación

VPN: Valor Predictivo Negativo.

La especificidad diagnóstica obtenida para las mutaciones de BRAF V600K y V600E, ha sido del 100% y del 98,33%, respectivamente. Esta última disminución en la especificidad se debe a la detección con el kit de una muestra positiva para la mutación poco prevalente V600D.

La especificidad diagnóstica obtenida para todas las mutaciones de MEK1 y de AKT1 ha sido del 100%.

Repetibilidad y Reproducibilidad diagnóstica

Los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad diagnóstica del kit se han obtenido sometiendo el DNA extraído de las muestras de la Tabla 11 de más abajo, a todos los pasos del protocolo hasta la etapa de visualización.

Los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos para el kit **CLART® CMA BRAF-MEK1-AKT1** se muestran en la Tabla 11:

	% homología
Repetibilidad (n=32)	98.43
Reproducibilidad (n=28)	97.67

Tabla 11

N: Número de muestras analizadas.

10. Control de interferencias conocidas

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos a una calidad inadecuada del ADN extraído (por insuficiente cantidad de muestra, degradación del ADN, pérdida del ADN, almacenaje incorrecto), o a la presencia de inhibidores de la DNA polimerasa en las muestras a procesar (alcohol, sales, etc.). Para evitar estas interferencias, deben seguirse las indicaciones que aparecen en las secciones 6 y 7 de este Manual.

11. REFERENCIAS

“PLX4032, a selective BRAF (V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells”.

Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, Krauthammer M, McCusker JP, Kluger Y, Sznol M.

Pigment Cell Melanoma Res. 2010 Apr;23(2):190-200. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00685.x. Epub 2010 Feb 10.

“Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring”.

Klinac D, Gray ES, Millward M, Ziman M.

Front Oncol. 2013 Mar 19;3:54. doi: 10.3389/fonc.2013.00054. eCollection 2013.

“Effects of AKT inhibitor therapy in response and resistance to BRAF inhibition in melanoma”.

Lassen A, Atefi M, Robert L, Wong DJ, Cerniglia M, Comin-Anduix B, Ribas A.

Mol Cancer. 2014 Apr 16;13:83. doi: 10.1186/1476-4598-13-83.

“Detection of BRAF V600 mutations in melanoma: evaluation of concordance between the Cobas® 4800 BRAF V600 mutation test and the methods used in French National Cancer Institute (INCa) platforms in a real-life setting”.

Mourah S, Denis MG, Narducci FE, Solassol J, Merlin JL, Sabourin JC, Scoazec JY, Ouafik L, Emile JF, Heller R, Souvignet C, Bergougnoux L, Merlio JP.

PLoS One. 2015 Mar 19;10(3):e0120232. doi: 10.1371/journal.pone.0120232. eCollection 2015.

“Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el melanoma metastásico. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica”.

José Luis Rodríguez-Peralto, Enrique Espinosa, Juan José Ríos-Martín, Alfonso Berrocal, María Dolores Lozano, Ana Arance, Angel Santos-Briz, José Antonio López-Martín, María Teresa Fernández-Figueras y Salvador Martín-Algarra.

Rev Esp Patol. 2014;47(1):9-21.

“Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma”.

Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Kim KB, Weber JS, Hersey P, Long GV, Lawrence D, Ott PA, Amaravadi RK, Lewis KD, Puzanov I, Lo RS, Koehler A, Kockx M, Spleiss O, Schell-Steven A, Gilbert HN, Cockey L, Bollag G, Lee RJ, Joe AK, Sosman JA, Ribas A.

J Clin Oncol. 2013 May 10;31(14):1767-74. doi: 10.1200/JCO.2012.44.7888. Epub 2013 Apr 8.