



CLART[®] CMA EGFR LB

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE MUTACIONES PUNTUALES,
INSERCIÓNES Y DELECCIONES EN EL GEN EGFR ASOCIADAS A CÁNCER DE PULMÓN
NO MICROCÍTICO EN BIOSIA LÍQUIDA**

PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

CLART[®] CMA EGFR LB

CLART[®], CLART-Strip[®], CAR[®] y SAICLART[®] son Marcas Registradas por GENOMICA.
Para ampliar la información descrita en este manual puede consultar la web:
www.genomica.com



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



Versión 2
Febrero 2017

ÍNDICE:

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS

2. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT

3.1. Reactivos de amplificación

3.2. Reactivos de visualización

3.3. Otros componentes

4. MATERIAL REQUERIDO Y NO SUMINISTRADO

4.1. Reactivos y material

4.2. Equipos

5. RECOMENDACIONES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

5.1. Recomendaciones generales

5.2. Precauciones para la extracción y la adición del material extraído al tubo de amplificación

5.3. Precauciones para la amplificación

5.4. Precauciones para la visualización

6. MUESTRAS

7. PROTOCOLO DE TRABAJO

7.1. Pre-tratamiento de la muestra

7.2. Extracción de ADN libre circulante a partir de plasma

7.3. Cuantificación de la concentración de ADN y adición de la muestra

7.4. Reacción de pre-amplificación

7.5. Reacción de amplificación específica de las mutaciones

7.6. Visualización del producto amplificado en CLART-Strip® (CS)

7.6.1 Visualización manual.

7.6.2. Visualización en autoclart®

8. LECTURA DE RESULTADOS

9. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

10. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO

11. BIBLIOGRAFÍA

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS



Atención, ver instrucciones de uso



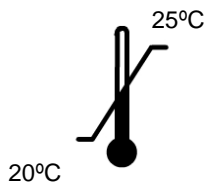
Fecha de caducidad



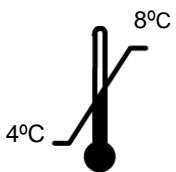
Producto sanitario para Diagnóstico *In Vitro*



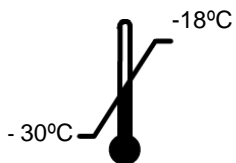
Lote



Conservar a temperatura ambiente



Conservar entre 4°C y 8°C



Conservar entre -30°C y -18°C

2. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

El análisis de las mutaciones presentes en muestras de biopsia sólida es un procedimiento crítico en pacientes con cáncer que da información crucial para el diagnóstico y la predicción de la respuesta del paciente a los posibles tratamientos. En algunas enfermedades, como en el cáncer de pulmón no microcítico, es difícil obtener la biopsia sólida para la determinación de biomarcadores, debido a la localización del tumor y a la débil salud del paciente que puede no soportar pruebas tan invasivas.

Las células tumorales liberan ADN libre circulante al torrente sanguíneo, obteniéndose tras la extracción, ADN procedente de estas células junto con ADN liberado por células sanas o células tumorales circulantes.

CLART® CMA EGFR LB detecta en muestras de plasma la presencia de las mutaciones más prevalentes en el gen que codifica para el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, EGFR (del inglés Epidermal Growth Factor Receptor), asociadas a cáncer de pulmón no microcítico. En un entorno clínico, el estudio de las mutaciones en el gen EGFR a partir de ADN tumoral circulante ayuda a seleccionar el tratamiento más adecuado en pacientes con cáncer de pulmón de células no microcíticas. Además permite monitorizar la emergencia de mutaciones asociadas a la resistencia a fármacos, como la mutación T790M frente a inhibidores de la tirosina quinasa (TKIs).

El kit **CLART® CMA EGFR LB** detecta un total de 39 mutaciones de alta prevalencia repartidas en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR, que aparecen descritas en la Tabla 1. Estas mutaciones están asociadas a sensibilidad o resistencia al tratamiento: las mutaciones que se encuentran en el exón 20 ofrecen resistencia al tratamiento, mientras que las del resto de exones se consideran activadoras y confieren un buen pronóstico al tratamiento.

MUTACIONES DETECTADAS Y PREVALENCIA		
EXONES	Tipo de mutation	
EXON 18	3 Mutaciones puntuales	Prevalencia
	G719A (c.2156 G>C)	0.3%-1.05%
	G719C (c.2155 G>T)	0.3%-1.05%
	G719S (c.2155 G>A)	0.3%-1.05%
EXON 19	28 Deleciones	Prevalencia
	6223* E746_A750del (c.2235_2249 del 15)	17.8%
	12370* L747_P753>S (c. 2240_2257del18)	3.4%

	12369* L747_T751del (c.2240_2254del15)	1.5%
	6255* L747_S752del (c. 2239_2256del18)	10.2%
	12384* E746_S752>V (c.2237_2255>T)	1.3%
	12382* E747_A750>P (c.2239_2248TTAAGAGAAG>C)	2.5%
	6225*, 12678*, 6218*, 12728*, 6220*, 12419*, 6210*, 13556*, 12386*, 12385*, 18427*, 12403*, 12383*, 6254*, 13551*, 12367*, 12422*, 12387*, 26038*, 13552*, 12416*, 23571*	< 1.5%
EXON 20		
	1 Mutación puntual	Prevalencia
	T790M (c.2369 C>T)	0.5-1.75%
	5 Inserciones	Prevalencia
	H773_V774insH (c.2319_2320insCAC)	0.4-3.22%
	D770_N771insG (c.2310_2311insGGT)	
	V769_D770insASV (c.2307_2308ins9GCCAGCGTG)	
	V769_D770insASV (c.2309_2310AC>CCAGCGTGGAT)	
	D770_N771insSVD (c.2311_2312ins9GCGTGGACA)	
EXON 21		
	2 Mutaciones puntuales	Prevalencia
	L858R (c.2573 T>G)	4.3-15.05%
	L861Q (c.2582 T>A)	0.2-0.7%

Tabla 1: Mutaciones detectadas por el kit **CLART® CMA EGFR LB**

MUESTRAS: Muestras de plasma de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

Una vez extraído el ADN circulante, la detección de mutaciones se lleva a cabo en dos pasos:

- 1- La **reacción de pre-amplificación de la muestra**.
- 2 La **reacción de amplificación específica de las mutaciones** deleción o inserción existente en la muestra a partir de la muestra pre-amplificada, originando un fragmento variable para cada una de entre unos 100-200 pares de bases.

Finalmente, la detección específica de las mutaciones amplificadas por PCR se lleva

a cabo mediante una plataforma tecnológica basada en microarrays de baja densidad: CLART® (Clinical Arrays Technology). La plataforma se fundamenta en un principio muy sencillo, pero a la vez muy cómodo y eficaz que consiste en imprimir un microarray en el fondo de un pocillo de placa microtiter, CLART-Strip® (CS), Figura 1, lo que simplifica todo el proceso de hibridación y visualización frente a los sistemas de microarrays clásicos.



Figura 1. Plataforma CLART-Strip® (CS) en forma de tira de 8 pocillos.

El sistema de detección con **CLART® CMA EGFR LB** se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del microarray en las que se produce la hibridación de los productos amplificados con las sondas específicas del array. Durante la PCR, los productos amplificados se marcan con biotina. Después de la amplificación, estos productos se hibridan con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del microarray, tras lo que se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato o-dianisidina, que precipita sobre las zonas del microarray en las que ocurre la hibridación (Figura 2).

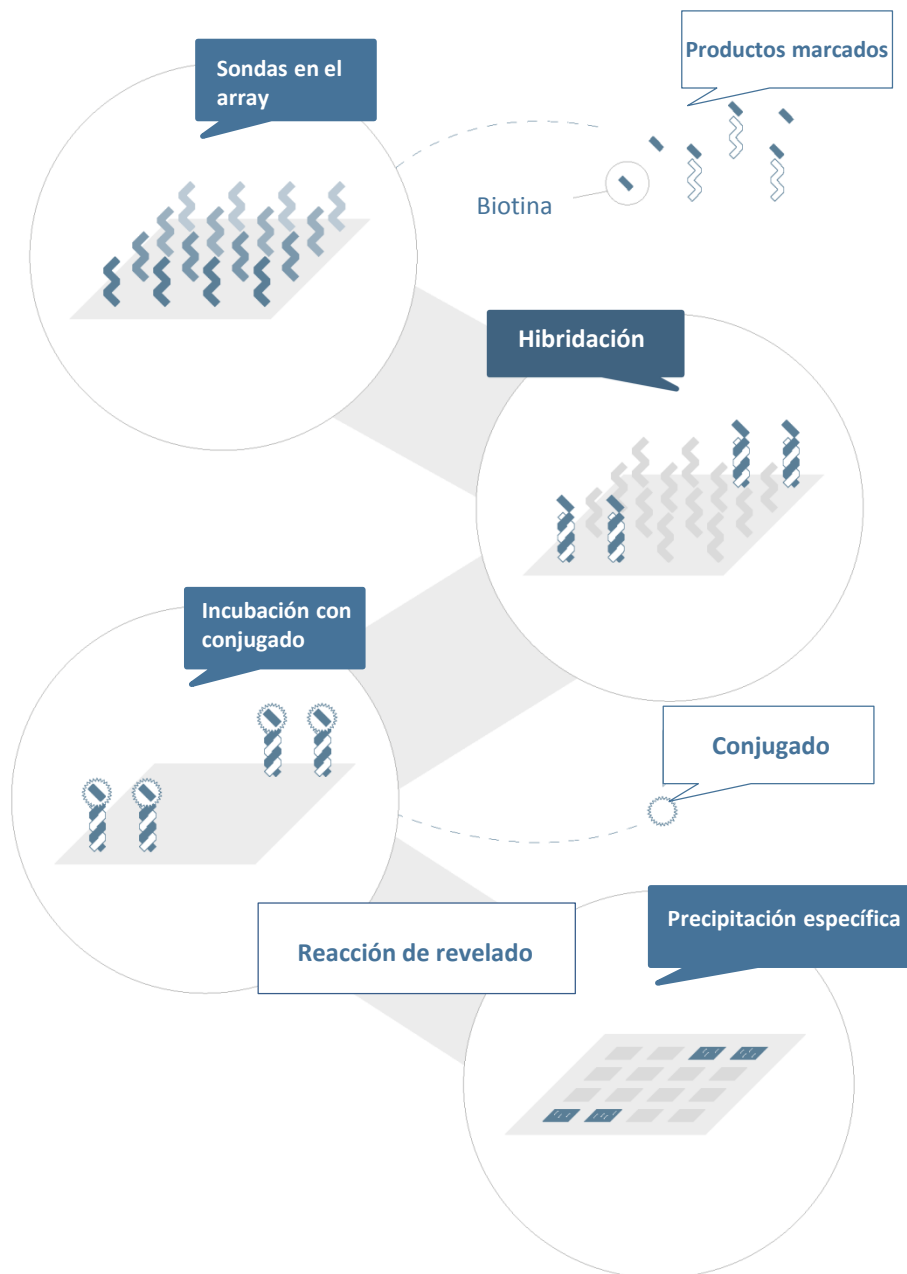


Figura 2: Esquema del método de visualización. Las sondas, inmovilizadas sobre la superficie, capturan sus productos amplificados complementarios marcados con biotina. A través de la biotina, se une el conjugado, en este caso estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano, *HorseRadish Peroxidase*). El sustrato o-dianisidina por la acción de la HRP, produce un precipitado sobre la zona en la que se produce la hibridación.

3.COMONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT

Los reactivos incluidos en el kit **CLART[®] CMA EGFR LB** se han agrupado en varias cajas, dependiendo de la temperatura a la que se han de conservar. Todos los reactivos son estables en las condiciones indicadas de conservación hasta la fecha de caducidad del kit.

3.1. Reactivos de amplificación

Se envían y se conservan a -20 °C.

1- Tubos de pre-amplificación listos para su uso. Sólo se debe descongelar sobre hielo el número preciso de tubos de pre-amplificación que se vayan a procesar en ese momento, conservando el resto de los tubos a -20°C. Para el análisis del gen EGFR con **CLART[®] CMA EGFR LB**, se envían 2 tubos de Pre-amplificación:

- ✓ **Tubo amarillo (Mix Pre-amp):** mix de pre-amplificación, contiene 30 µl de mezcla de reacción.
- ✓ **Tubo amarillo marcado en la tapa (Mix CI):** tubo con los controles internos de la reacción, contiene 45 µl de reacción.

2- Tubos de amplificación específica de las mutaciones listos para su uso. Contienen 45 µl de mezcla de reacción. Sólo se debe descongelar sobre hielo el número preciso de tubos de amplificación que se vayan a procesar en ese momento, conservando el resto de los tubos a -20°C. Para el análisis del gen EGFR con **CLART[®] CMA EGFR LB**, se envían 4 tubos de amplificación:

- ✓ Mix 1: tubo blanco
- ✓ Mix 2: tubo blanco y marcado en la tapa
- ✓ Mix 3: tubo rojo
- ✓ Mix 4: tubo azul

Mix 1: (Tubo blanco) y Mix 2: (Tubo blanco y marcado en la tapa): Estos tubos detectan:

- EXÓN 21: L858R Y L861Q
- EXÓN 19: DELECCIONES
- EXÓN 18: G719C, G719A, G719S

Mix 3: (Tubo rojo) y Mix 4: (Tubo azul): estos tubos detectan:

- EXON 20: T790M e Inserciones

Nota: En la caja del kit se incluye 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. Reactivos 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:
 - **Tiras CLART® Strips (CS)** (incluyendo todas las sondas específicas). Se suministran en tiras de 8 pocillos en el interior de un sobre termosellado. **Conservar siempre cerrado, a temperatura ambiente (máx. 25°C) y protegido de la luz.**
 - **SH** (Solución de Hibridación). **Conservar a temperatura ambiente**
- Envío y almacenaje a 4°C:
 - **DC** (Diluyente de Conjugado). **Conservar a 4 °C.**
 - **CJ** (Conjugado). **Conservar a 4 °C.** Dar un pulso en la centrífuga antes de usar.
 - **RE** (Solución de Revelado). **Conservar a 4 °C y protegido de la luz.**
 - **TL** (Tampón de Lavado). **Conservar a 4 °C.**
 - **Soporte y tapa para tiras de 8 pocillos.**

3.3. Otros componentes

- **Lector CAR®** (CLINICAL ARRAY READER): permite la lectura e interpretación automática de hasta 12 tiras de arrays CS, es decir, de hasta un máximo de 96 muestras.
- **SAICLART®**: software desarrollado por GENOMICA para el procesamiento de imágenes.
- **Software específico del kit CLART® CMA EGFR LB** diseñado y validado por GENOMICA.



Figura 3. CAR® (CLINICAL ARRAY READER)

4. MATERIAL REQUERIDO Y NO SUMINISTRADO

A continuación se enumera todo el material requerido que no es suministrado con el kit.

4.1. Reactivos y material

- Agua destilada.
- Guantes desechables.
- Puntas de pipeta con filtro o desplazamiento positivo.
- Recipiente con hielo picado.
- Tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml autoclavados.
- Gradillas para tubos de 1,5 ml.
- Soporte para tubos de 0,5 ml/0,2 ml.
- Lejía
- Kit QIAamp Circulating Nucleic Acid. Qiagen.
- PBS (solución buffer fosfato)
- kit *Qubit dsDNA HS Assay*

4.2. Equipos

- Centrífuga con capacidad de enfriar a 4°C y de alcanzar 16.000g.
- Espectrofotómetro de Fluorometría.
- Termociclador.
- Cabina de seguridad biológica de tipo II.

- Bomba de vacío capaz de hacer un vacío de –800 a –900 mbar para la extracción del ADN del plasma.
- Tres micropipetas ajustables entre 1-20 µl, 20-200 µl y 200-1000 µl para el laboratorio de extracción.
- Una micropipeta ajustable entre 1-20 µl, para añadir el material genético a los tubos de amplificación.
- Tres micropipetas ajustables entre 1-20 µl, 20-200 µl y 200-1000 µl para el laboratorio de visualización.
- Termobloque (Thermomixer) con adaptador de placa, tapa y con agitación ajustable a 20°C, 25°C y 50°C. Compatible con placas de 96 pocillos.
- Agitador vórtex.
- Sistema de vacío.
- QIAvac 24 Plus
- Baño o termobloque con adaptador para falcon de 50 ml.
- Microcentrífuga para tubos de 1.5 ml.

5.- RECOMENDACIONES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

¡Muy importante para evitar contaminaciones!. Leer detenidamente antes de comenzar la técnica.

5.1. Recomendaciones generales

1. La técnica debe realizarse en **dos áreas separadas físicamente**, para evitar posibles contaminaciones de las muestras con el producto amplificado por PCR. Cada área debe tener su propio material de trabajo identificado (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc) que debe ser intransferible.

1.1 Área pre-PCR: En esta área se realiza la preparación de las muestras y la extracción del ADN de las mismas. Para la preparación de las muestras y la extracción del ADN se recomienda utilizar una cabina de bioseguridad de tipo II. Las muestras deben manipularse manteniendo todas las medidas de esterilización posibles para evitar contaminaciones. Una vez extraído el ADN de la muestra, éste se añade a los tubos de pre-amplificación en el área pre-PCR.

1.2 Área post-PCR: En esta área se lleva a cabo la reacción de pre-amplificación, la reacción de amplificación específica de las mutaciones y finalmente la visualización del producto amplificado. El material disponible en el área post-PCR debe ser intransferible, nunca debe entrar en contacto con el material del área pre-PCR. Se recomienda evitar trabajar en el área pre-PCR después de haber estado trabajando en el área post-PCR.

2. Uso de guantes en todo momento. Es recomendable cambiarse de guantes con cierta frecuencia y obligatoriamente cada vez que se empieza a trabajar en las áreas

antes descritas. Se recomienda el cambio de guantes cuando se añada el ADN a los tubos de amplificación.

3. Limpiar las zonas de trabajo (poyatas, campanas, gradillas, pipetas) con lejía diluida al 10% cada vez que se procese una tanda de muestras. En caso de que se produjera una contaminación en alguna de las áreas de trabajo, es obligatorio realizar una limpieza adicional con el mismo producto. Los termocicladores y termomixers, se limpiarán antes y después de su uso.

4. Emplear siempre puntas con filtro y pipetas de desplazamiento positivo para evitar contaminaciones. Cada área de trabajo debe contar con un juego de pipetas diferente e intransferible.

5. Emplear material de laboratorio desechable y autoclavado.

6. No mezclar reactivos de viales diferentes aunque sean del mismo lote.

7. Cerrar los tubos de reactivos inmediatamente después de su uso para evitar contaminaciones.

8. Desechar la punta de la micropipeta después de cada pipeteo.

5.2. Precauciones para la extracción de la muestra y la adición del ADN extraído al tubo de amplificación.

1. Utilizar guantes en todo momento.
2. Limpiar las superficies de trabajo de la cabina de bioseguridad con lejía diluida al 10%.
3. Encender el flujo laminar y la luz UV durante al menos 20 minutos antes de comenzar la extracción. Apagar la luz UV cuando se esté trabajando dentro de la cabina.
4. Se recomienda la manipulación de las muestras de plasma en el interior de la cabina.

5.3 Precauciones para la amplificación

1. Colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando el bloque haya sobrepasado los 90°C. De este modo se minimizan las posibles amplificaciones inespecíficas debidas a incubación por debajo de la temperatura de hibridación.
2. Uso exclusivo en termocicladores “convencionales” que tengan velocidad de rampa de enfriamiento/calentamiento de 2-3°C por segundo, como máximo, y bloque de aluminio. No usar termocicladores de rampas rápidas.

En algunos modelos de termocicladores de rampas rápidas se puede bajar la velocidad de la rampa a 3°C por segundo.

Este kit ha sido validado en los termocicladores: Mastercycler®nexus de Eppendorf y Applied Biosystems 2720.

3. Se recomienda usar termocicladores “convencionales” y verificar antes de su uso las rampas de temperatura. Los valores deberían situarse en los siguientes límites:

Pre amplificación

Temperaturas (°C)	Tiempo (Seg)
95°C → 94°C	0.1
94°C → 66°C	23.7
66°C → 94°C	27.8
66°C → 72°C	10.8

Amplificación

Temperaturas (°C)	Tiempo (Seg)
95°C → 94°C	0.1
94°C → 62°C	26.8
62°C → 94°C	30.3
62°C → 72°C	14.7

5.4 Precauciones para la visualización

1. Antes de comenzar el ensayo se recomienda verificar el THERMOMIXER a las temperaturas a las cuales va a ser utilizado: 20°C, 25°C y 50°C. Para ello utilizar una sonda termopar en contacto directo con la placa del THERMOMIXER.
2. El producto de PCR solo debe ser desnaturalizado una única vez para su hibridación. No realizar ninguna visualización utilizando un producto de PCR que haya sido desnaturalizado más de una vez. Si se tiene esta necesidad, hacer alícuotas previamente al paso de desnaturalización.
3. Evite que la punta de la pipeta o del sistema de vacío toque el fondo del pocillo, ya que podría dañar las sondas fijadas en el fondo del pocillo.
4. Se recomienda añadir cada solución sobre la pared del pocillo CS, nunca directamente sobre el fondo.
5. La solución de hibridación a temperatura ambiente cristaliza, por lo que antes de uso debe calentarse a 50°C hasta que la solución sea homogénea. Es conveniente no añadir la solución SH (Solución de hibridación) hasta que se vayan a añadir los productos de PCR desnaturalizados. Mantener dicha solución de hibridación a 50°C hasta que sea añadida.

6. El array no debe quedarse totalmente seco.
7. Tras la incubación con la solución CJ, es muy importante lavar bien el array para evitar que queden restos de éste que reaccionen con la solución RE, produciendo un precipitado inespecífico que pueda dar lugar a interpretaciones erróneas del resultado.
8. Evitar la formación de burbujas sobre la superficie del array al añadir cualquiera de las distintas soluciones.
9. Al visualizar la imagen en el lector, comprobar que aparezcan los marcadores de posición. Evitar la presencia de burbujas o manchas que interfieran en la lectura. En caso contrario, limpiar el fondo exterior del pocillo con un papel de celulosa.

6. MUESTRAS

El kit **CLART[®] CMA EGFR LB** ha sido diseñado y validado para su uso a partir de ADN tumoral circulante extraído de plasma de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

GENOMICA no se responsabiliza de los resultados obtenidos con otro tipo de muestras.

7. PROTOCOLO DE TRABAJO

CLART[®] CMA EGFR LB ha sido validado usando los protocolos descritos a continuación para el procesamiento de la muestra de sangre y para la extracción de ADN libre circulante.

7.1. Extracción del plasma

- 7.1.1. Extraer entre 5-10 ml de sangre del paciente y recogerlos en tubos que contengan EDTA como anticoagulante. Es importante extraer el volumen de sangre recomendado ya que se deben obtener al menos 2 ml de plasma.
- 7.1.2. Inmediatamente a la extracción de sangre del paciente, invertir los tubos suavemente 10 veces.
- 7.1.3. Recoger la información del paciente y rotular los tubos con su código identificativo. Apuntar el día y hora en que se ha realizado la extracción de sangre.
- 7.1.4. **Los tubos de sangre deben mantenerse a 4°C tras la extracción.** De manera inmediata se debe llevar a cabo la separación del plasma de la sangre, realizando dos centrifugaciones consecutivas, sin pausas entre ellas.

- 7.1.5. Centrifugar las muestras de sangre a 1900g (3000 rpm) durante 10 min a 4°C de temperatura.
- 7.1.6. Con cuidado, aspirar el sobrenadante sin perturbar la capa leucocitaria, dejando alrededor de 5mm de plasma por encima de esta capa, evitando de este modo la contaminación con células. Transferir el sobrenadante a tubos de centrifuga de 15ml de base cónica, debidamente etiquetados con los códigos de los pacientes.
- 7.1.7. Centrifugar el plasma durante 10 minutos a 16000g (en rotor de ángulo fijo) y a 4°C de temperatura.
- 7.1.8. Aspirar el sobrenadante, dejando alrededor de 7mm de plasma, para evitar perturbar el sedimento. Transferir el plasma a viales de congelación de 2ml, debidamente etiquetados. Por cada 10ml de sangre se obtienen aproximadamente 2 viales de 2ml de plasma. Anotar el volumen de plasma obtenido.
- 7.1.9. Congelar el plasma a -80°C inmediatamente si la muestra no se va procesar inmediatamente. En caso contrario, almacenar a 4°C. El plasma congelado sólo se debe descongelar una vez, por ello se recomienda hacer alícuotas de 2 ml de plasma.

7.2. Extracción de ADN libre circulante a partir de plasma

Para la extracción de ADN libre circulante a partir del plasma se recomienda utilizar el Kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El volumen final para llevar a cabo la elución debe ser de 30 µl.

El procedimiento completo tiene una duración de en torno a 2 horas y consta de cuatro fases:

- lisado de la muestra
- unión a la matriz de la columna
- lavado
- elución

Las columnas "QIAamp Mini columns", incluidas en el kit, se conectan a una bomba de vacío que permite evitar sucesivos pasos de centrifugación. Estas columnas pueden unir ácidos nucleicos fragmentados de hasta 20 bases, y su rendimiento depende del volumen de la muestra y la concentración de ácidos nucleicos en la misma.

Se recomienda seguir los siguientes pasos:

- 7.2.1. Aunque el volumen de partida puede ser de hasta 5ml, emplear sólo 2ml de plasma para cada columna. Se deben seguir los pasos descritos en el protocolo del kit para un volumen de partida de 2ml.
- 7.2.2. Descongelar los 2ml de plasma a temperatura ambiente y a continuación, mantenerlo a 4°C hasta la extracción. La extracción de ADN debe realizarse inmediatamente a la descongelación del plasma ya que el ADN libre tiene una vida media muy corta. En el caso de que el volumen de plasma sea inferior a 2 ml, añadir PBS hasta completarlo. No utilizar menos de 2 ml de plasma, ya que por debajo de ese volumen los parámetros de sensibilidad de **CLART® CMA EGFR LB** podrían no mantenerse.
- 7.2.3. Si se dispone del "QIAvac 24 Plus", se podrán procesar hasta 24 muestras de plasma en paralelo.
- 7.2.4. Una vez acabado el proceso, añadir 30µl de buffer AVE (incluido en el kit de extracción de ADN libre circulante) en el centro de la membrana QIAamp Mini. Cerrar la tapa e incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Centrifugar en una microcentrífuga a 14000 rpm durante 1 minuto. A continuación para obtener un mayor rendimiento de cfDNA, volver a añadir los 30 µl de eluido ya obtenido en el centro de la membrana QIAamp Mini. Cerrar la tapa e incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Centrifugar en una microcentrífuga a 14000 rpm durante 1 minuto para eluir los ácidos nucleicos.

La muestra se recogerá en un tubo de 1.5 ml debidamente identificado.

A continuación se medirá la concentración de ADN de la muestra. Si la cuantificación se va a realizar en el mismo día, mantener la muestra a 4°C, si se va a realizar en días posteriores, se debe almacenar a -20°C.

7.3. Cuantificación de la concentración de ADN y adición de la muestra

7.3.1 Cuantificación de la concentración de ADN

Se recomienda cuantificar la concentración de ADN libre preferentemente con Qubit® 3.0 Fluorometer (seguir las recomendaciones del manual de usuario Qubit® 3.0 Fluorometer, ThermoFisher Scientific). La cuantificación se realiza a partir de 2 µl de ADN extraído con el kit *Qubit dsDNA HS Assay*. Las muestras deben almacenarse a -20°C una vez realizada la cuantificación de la concentración. No descongelar el ADN extraído más de una vez.

En caso de no disponer de un Qubit® 3.0 Fluorometer, utilizar otro método de cuantificación similar que permita detectar concentraciones inferiores a 0.5 ng/µl. No se debe cuantificar utilizando métodos basados en la medida de la absorbancia, ya que pueden no detectar las bajas concentraciones de ADN de doble cadena presente en este tipo de muestras.

Las concentraciones de ADN esperadas deben encontrarse en un rango entre 0.05 ng/ μ l - 5 ng/ μ l en el 95% de los pacientes. En pacientes con una proporción baja de ADN tumoral circulante mutado podría ocurrir que las mutaciones no fueran detectadas. Cuando la concentración de ADN libre circulante obtenida se encuentre por debajo de 0.05 ng/ μ l, se recomienda repetir la extracción siempre que sea posible, para asegurar un resultado fiable.

7.3.2 Adición del ADN tumoral circulante

El siguiente paso tras la cuantificación del ADN libre circulante consiste en la adición del ADN al tubo de pre-amplificación (tubo amarillo). Se deben añadir 10 ng totales de ADN al tubo de pre-amplificación. Un exceso o defecto de ADN puede dar lugar a un diagnóstico erróneo. A continuación se muestra cómo proceder:

- Si se obtiene una concentración de ADN entre 0.05 ng/ μ l y 0.5 ng/ μ l añadir 20 μ l de ADN al tubo de pre-amplificación.
- Si se obtiene una concentración de ADN superior a 0.5 ng/ μ l diluir la muestra a una concentración de 0.5 ng/ μ l, añadir el volumen indicado en la tabla 7.1 al tubo de pre-amplificación.

Concentración inicial de ADN (ng/ μ l)	Preparación dilución ADN a 0.5 ng/ μ l		ng de ADN/tubo pre-amplificación
	Volumen de ADN (μ l)	Volumen de agua (μ l)	
0.5	20	-	10
0.6	20	4	10
0.7	20	8	10
0.8	15	9	10
0.9	15	12	10
1	15	15	10
2	10	30	10
3	5	25	10
4	5	35	10
5	5	45	10

Tabla 7.1. Volúmenes de agua y muestra necesarios para añadir 10ng de muestra en el tubo de pre-amplificación

- Si se realiza la técnica con una menor concentración, el resultado solo puede ser considerado si es positivo.

Es importante incluir un control negativo de extracción (con agua) para comprobar que las muestras no hayan sufrido contaminaciones durante los procesos de extracción, amplificación y visualización, lo que daría lugar a un falso positivo.

7.4. Reacción de pre-amplificación

Recomendaciones específicas para la pre-amplificación:

- Trabajar en el **área pre-PCR**, siempre en campana y siguiendo las recomendaciones del punto 5.1.
- Durante el proceso mantener los tubos separados y refrigerados.
- No trabajar con más de un tubo de preamplificación a la vez abierto.

Reacción de pre-amplificación:

1. Descongelar a 4°C un tubo de pre-amplificación por muestra (tubo amarillo) y un tubo control para cada dos muestras (tubo amarillo marcado).
2. Centrifugar unos segundos todos los tubos en la microcentrífuga para que quede todo el líquido en el fondo del tubo (si no se dispone de adaptadores de microcentrífuga para los tubos, se pueden utilizar en su lugar tubos de un tamaño mayor a los que se les haya cortado la tapa).
3. Añadir 20 µl de muestra a los tubos de pre-amplificación (seguir el apartado 7.4) y resuspender varias veces con la micropipeta. Mantener los tubos refrigerados en todo momento.
4. Mantener el tubo de control (tubo amarillo marcado) a 4°C sin abrir. El tubo control se introduce en el termociclador directamente sin adición de ninguna muestra.
5. Introducir en el termociclador un número n de tubos de pre-amplificación (un tubo por muestra) y un número n/2 de tubos control.
6. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

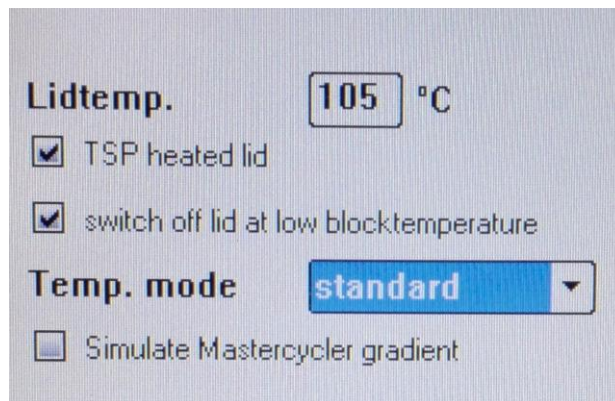
- A. Modelo Mastercycler® Nexus Eppendorf o modelos con rampa de calentamiento de 3°C/seg y rampas de enfriamiento de 2°C/seg. Bloque de aluminio:

1 ciclo	95°C 15 min
40 ciclos	94°C 1min 66°C 1min
1 ciclo	72°C 10 min
4°C continuo hasta la recogida de tubos	

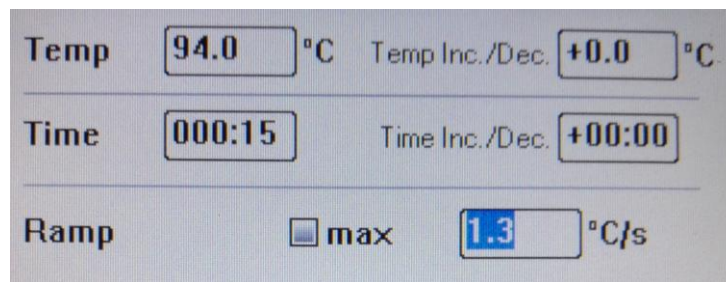
NOTA: Muchos de estos termocicladores presentan diferentes opciones

de PCR. Para el modelo Mastercycler® Nexus Eppendorf seleccionar las siguientes opciones:

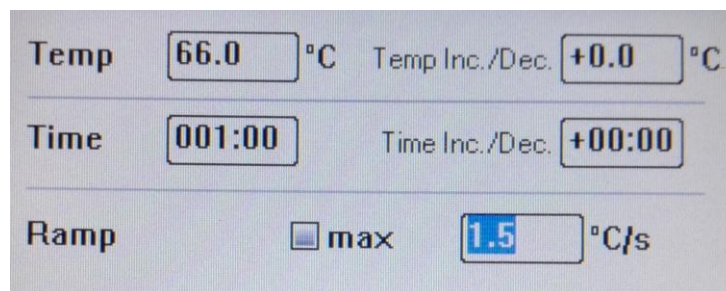
1. Seleccionar la opción "STANDARD". No seleccionar la opción "Simulated Mastercycler gradient"



2. Seleccionar la rampa 1.3°C/s en la temperatura de 94°C:



3. Seleccionar la rampa 1.5°C/s en la temperatura de 66°C:



- B. Modelo Applied Biosystems 2720 o modelos con rampa de calentamiento y enfriamiento de 2.7°C/s. Bloque de aluminio:

1 ciclo	95°C 15 min
40 ciclos	94°C 1 min 66°C 1 min
1 ciclo	72°C 10 min
4°C continuo hasta la recogida de tubos	

Iniciar el programa y colocar los tubos en el termociclador cuando el **bloque haya sobrepasado los 90°C**.

7.5. Reacción de amplificación específica de las mutaciones

Recomendaciones específicas para la amplificación:

- Trabajar en el **área post-PCR**
- Durante el proceso mantener los tubos separados y refrigerados.
- No trabajar a la vez con más de un tubo de amplificación abierto procedentes de diferentes pacientes

Reacción de de amplificación específica de las mutaciones

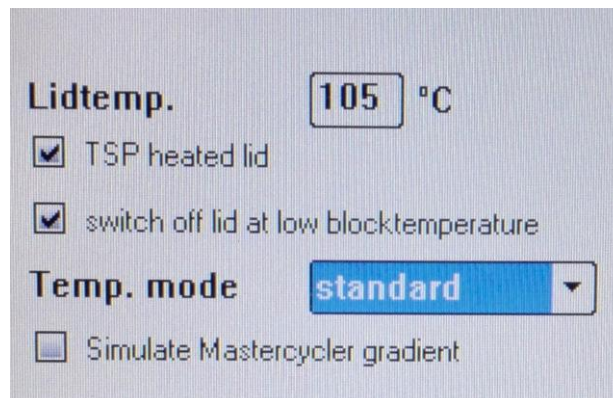
1. Una vez terminada la reacción de pre-amplificación, sacar los tubos del termociclador y agitar en un vórtex durante unos segundos. Centrifugar a continuación los tubos en la microcentrífuga.
2. Una vez finalizada la PCR de pre-amplificación, la PCR específica debe realizarse en un **plazo máximo de 24 horas**. Para evitar su degradación, el producto amplificado se conservará a 4°C hasta su uso.
3. Añadir 2µL del producto de PCR pre-amplificado a cada tubo de amplificación específica (tubos de color blanco, blanco marcado, rojo y azul).
4. Añadir 2µl de control amplificado a cada tubo de amplificación específica (tubos de color blanco, blanco marcado, rojo y azul).
5. Repetir el mismo proceso para cada una de las muestras.
6. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

- A. Modelo Mastercycler® nexus Eppendorf o modelos con rampa de calentamiento de 3°C/s y rampas de enfriamiento de 2°C/s, con bloque de aluminio:

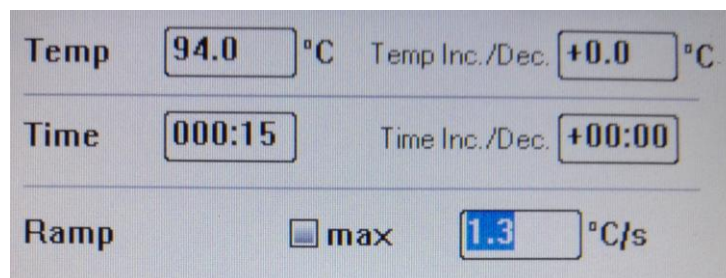
1 ciclo	95°C 15 min
22 ciclos	94°C 15 seg 62°C 60 seg
1 ciclo	72°C 10 min
4°C continuo hasta la recogida de tubos	

NOTA: Muchos de estos termocicladores presentan diferentes opciones de PCR. Para el modelo *Mastercycler® nexus Eppendorf* seleccionar las siguientes opciones:

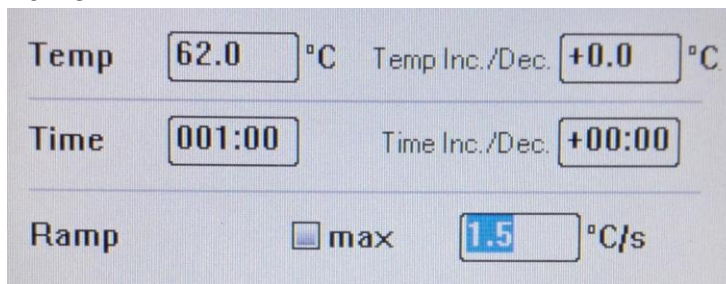
1. Seleccionar la opción “STANDARD”. No seleccionar la opción “Simulated Mastercycler gradient”.



2. Seleccionar la rampa 1.3°C/s en la temperatura de 94°C:



3. Seleccionar la rampa 1.5°C/s en la temperatura de 62°C:



- B. Modelo Applied Biosystems 2720 o modelos con rampa de calentamiento y enfriamiento de 2.7°C/s y bloque de aluminio:

1 ciclo	95°C 15 min
20 ciclos	94°C 15 seg 62°C 60 seg
1 ciclo	72°C 10 min
4°C continuo hasta la recogida de tubos	

7. Iniciar el programa y colocar los tubos en el termociclador cuando el bloque haya sobrepasado los 90°C.

El producto amplificado debe visualizarse en el **plazo máximo de 24 horas**, para evitar la degradación del mismo, se conservará a 4°C hasta su uso.

7.6. Visualización del producto amplificado en CLART-Strip® (CS)

Recomendaciones específicas antes de comenzar la visualización:

EL PROTOCOLO DESCRITO A CONTINUACIÓN SE DEBE REALIZAR SIEMPRE EN EL **ÁREA POST-PCR**. NUNCA LLEVAR EL PRODUCTO AMPLIFICADO AL ÁREA DE PRE-PCR.

1. Encender el CAR® (CLINICAL ARRAY READER) al comienzo del proceso. La autocalibración del equipo tarda unos minutos y es necesario además introducir el nombre de las muestras de cada pocillo en el programa antes de la lectura. El aparato debe estar listo en el momento de la lectura para evitar esperas innecesarias que produzcan un exceso de revelado.
2. Asegurarse de que antes de comenzar la hibridación, el termomixer de placas ha estado a 50°C durante al menos 60 minutos.
3. La solución de hibridación a temperatura ambiente cristaliza, por lo que antes de uso debe calentarse a 50°C hasta que la solución sea homogénea, debe mantenerse a 50°C hasta que sea añadida.
4. PREPARAR LA SOLUCIÓN DE LAVADO ANTES DE CADA ENSAYO, NO REUTILIZAR SOLUCIONES O RESTOS PREPARADAS CON ANTERIORIDAD.
5. Limpiar el termociclador con solución de lejía diluida al 10% antes de poner en marcha el programa de desnaturalización. Colocar los tubos de amplificación separados en el termociclador durante el proceso y nunca sobrepasar los 10 minutos de desnaturalización.
6. Durante la visualización no hace falta utilizar puntas con filtro pero sí es necesario usar una punta diferente para cada pocillo y cambiarla cada vez que se añade un reactivo, aunque se trate de TL. Sí es necesario utilizar puntas con filtro durante la adición de amplificadores al tubo CS.
7. En el caso de utilizar bombas de vacío equipadas con peines de 8 puntas para aspirar las soluciones, desechar los peines después de cada uso o descontaminarlos 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.
8. Aspirar completamente las diferentes soluciones dentro de los pocillos sin tocar el array.

7.6.1 Visualización manual del producto amplificado:

1. Desnaturalización: utilizar el termociclador para desnaturalizar los productos de PCR. Para este paso, colocar los tubos amplificados en el termociclador e incubar a 95°C durante 8 minutos. Sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo o a 4°C. **No exceder en más de 10 minutos el tiempo de desnaturalización.**

2. Preparación de la Solución TL diluida: Por cada tira CS (8 pocillos en total), preparar 10 ml de solución de lavado diluida, añadiendo 1 ml de Solución TL a 9 ml de agua destilada.
3. Prelavado de los CS: antes de empezar el ensayo es necesario lavar los CS añadiendo 200 µl de Solución TL diluida a cada pocillo. Resuspender de 10 a 15 veces con la pipeta multicanal, teniendo en cuenta que no se debe tocar la superficie del array. **Se recomienda realizar este lavado mientras se están desnaturalizando los amplificadores y mantener la solución de lavado en la tira hasta que se vaya a proceder a la adición de los mismos.** Retirar la solución TL diluida con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío.

El array debe quedar sin restos de solución, aunque nunca debe permanecer seco. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

4. Hibridación: Antes de usar la Solución SH calentarla a 50°C hasta la total dilución de las sales. Añadir **100 µl de solución SH** (evitar que se forme espuma) a cada pocillo de los CS. A continuación, añadir los siguientes volúmenes del producto de PCR desnaturalizado de cada mix al mismo pocillo del array:

Mix 1: 5 µl

Mix 2: 5 µl

Mix 3: 5 µl

Mix 4: 5 µl

Usar un array por muestra/paciente. Resuspender varias veces para que se mezcle con la solución de hibridación SH, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. Se recomienda cargar cada tira de manera independiente y separada del resto para evitar contaminaciones. Cubrir con la tapa de plástico e incubar en el termomixer de placa, tapado, durante **1 hora a 50°C, agitando a 550 rpm** (previamente el termomixer debe ser precalentado a 50°C al menos durante 60 min, asegurarse de que el termomixer alcanza 50°C correctamente, ver punto 5.3). Es condición indispensable para la correcta interpretación de los resultados visualizar todos los tubos de la misma muestra en el mismo pocillo.

Tras esta incubación, sacar la placa del termomixer y retirar la solución SH de los pocillos con pipeta o bomba de vacío. El array debe quedar sin restos de solución, aunque nunca debe permanecer seco. Añadir la siguiente solución inmediatamente. Programar el termomixer a 20°C y en movimiento para su utilización posterior en el paso 6.

5. Doble Lavado: añadir 200 µl de Solución TL diluida a cada pocillo. Resuspender entre 10 a 15 veces con la pipeta multicanal. Retirar la solución TL diluida con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío multicanal sin dejar remanente. Repetir la operación. Usar puntas nuevas para cada lavado. Si llegado a este paso, el termomixer no hubiera llegado a los 20°C, se dejan los pocillos con esta solución hasta que el termomixer reduzca la temperatura.

6. Bloqueo y conjugado: se recomienda centrifugar la solución CJ de alta afinidad durante 10 segundos antes de usarla. A continuación, preparar la solución de CJ diluido. Para ello se debe añadir **15 µl de Solución CJ de alta afinidad** a 1 ml de solución DC por cada tira a procesar. Esta solución se debe de preparar 5 minutos antes de finalizar el tiempo de la hibridación.

Retirar al máximo la solución TL diluida y añadir a cada pocillo del CS 100 µl de Solución CJ diluida. Incubar durante **30 minutos en el termomixer a 20°C, agitando a 550 rpm**. Tras esta incubación, sacar la placa y desechar la solución rápidamente, con pipeta o bomba de vacío. Dejar programado el termomixer de placa a 25°C y en movimiento para su utilización posterior en el paso 8.

7. Triple Lavado: **añadir inmediatamente** 200 µl de solución TL diluida a cada pocillo del CS, resuspender entre 10 a 15 veces con la pipeta multicanal y retirar completamente la solución con la pipeta o vacío. **Repetir la operación dos veces más**. Es **muy importante** que no queden restos de Solución CJ ya que ésta reaccionaría con la Solución RE dando lugar a una señal inespecífica.
8. Revelado: retirar el máximo de solución TL diluida y añadir 100 µl de solución RE a cada pocillo. Incubar **10 minutos a 25°C** en el termomixer **sin agitación**. (Asegúrese que el termomixer ha alcanzado 25°C).

¡Advertencia! Es muy importante utilizar el termomixer sin agitación.

9. Retirar la solución RE completamente del pocillo. **El array debe quedar seco**.
10. CAR® (CLINICAL ARRAY READER): Coloque la placa dentro del CAR®, éste analizará las muestras automáticamente.

7.6.2. Visualización en AutoCLART

1. Encender el equipo AutoCLART y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla:
2. Cerrar la puerta y pulsar el mando.
3. Seleccionar Run en el menú de inicio.
4. Seleccionar el tipo de ensayo a realizar: **CMA**.
5. Seleccionar el pocillo de la tira en el que se desea comenzar: A1 o E1, en el caso de que se reutilice un CS donde se han procesado previamente los 4 primeros arrays.
6. Seleccionar el número de muestras. Con AutoCLART se pueden procesar desde 4 a 96 muestras. El número de muestras debe ser un múltiplo de 4.

7. Confirmar que el número de muestras y el pocillo de inicio (A1 o E1) es correcto.
8. Colocar el rack completo de puntas en su posición correspondiente.
9. Chequear que el contenedor de puntas y el contenedor de desecho de reactivos están vacíos.
10. Llenar la botella de agua destilada con 250 ml de agua destilada.
11. Añadir los volúmenes de reactivos que AutoCLART solicita en función del número de muestras que se quieran procesar:

TL (Tampón de lavado). El volumen que aparece en la pantalla, indica la cantidad de TL diluido necesaria. Para preparar el TL diluido realizar una dilución 1:10 del TL en agua destilada.

CJ (Conjugado). Se recomienda centrifugar el CJ durante 10 segundos antes de usarse. La pantalla indica la cantidad de solución CJ diluida necesaria: se prepara añadiendo **1 ml de DC (Diluyente de Conjugado) y 15 µl de Solución CJ** multiplicado por el número de mililitros necesarios. Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

RE (Revelado). Añadir el volumen de revelado indicado en la pantalla.

- 12.
13. Desnaturalización: utilizar el termociclador para desnaturalizar los productos de PCR. Para este paso colocar los tubos amplificados en el termociclador e incubar a 95°C durante 8 minutos. Sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo. Importante: ¡desnaturalizar los productos de PCR antes de preparar los reactivos de visualización en el autoclart®!
14. **SH** (Solución de Hibridación). Añadir el volumen de solución de hibridación atemperada a 50°C (durante la menos 30 minutos) que aparece en la pantalla.

ADVERTENCIA: Es imprescindible añadir la SH en este punto, si se añade antes puede suceder que disminuya demasiado la temperatura de la solución de hibridación con la consecuente bajada de intensidad de las sondas pudiendo dar lugar a la aparición de falsos negativos.

- 15.
16. Cerrar la puerta y pulsar el mando para comenzar.
El equipo realizará el pre-lavado de los CS y la adición de la solución de hibridación. A continuación emitirá un pitido para indicar que es el

momento de la adición de las muestras, el pitido cesará cuándo el usuario abra la puerta del equipo.

17. Para añadir las muestras sacar los CS del AutoCLART y adicionar 5 µl de producto de PCR desnaturalizado de las mixes 1 ,2, 3 y 4 de EGFR LB a cada pocillo de los CS, resuspender varias veces para que se mezcle con la solución de hibridación con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. A continuación introducir de nuevo la placa en el AutoCLART y pulsar el mando para que continúe el proceso de visualización.
18. Cuando ha terminado el proceso de visualización, el AutoCLART emite un pitido hasta que el usuario abre la puerta del equipo para sacar los CS y proceder a la lectura en el CAR.
19. CAR (Clinical Arrays Reader): se coloca un adaptador especial sobre la bandeja del CAR y a continuación se colocará la placa encima del adaptador para tomar las imágenes de todos los pocillos para posteriormente ser analizadas automáticamente.

8. LECTURA DE RESULTADOS

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El equipo de lectura y análisis presentará un informe en el que se indican los resultados.

9. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para la interpretación correcta de los resultados, la muestra debe ser procesada con todos los tubos de amplificación y visualizada en el mismo array.

Se debe incluir un control negativo para comprobar que las muestras no hayan sufrido contaminaciones durante los procesos de extracción, amplificación y visualización, lo que daría lugar a un resultado falso positivo.

Los tubos de amplificación llevan su propio control de amplificación y de extracción para asegurar que hay suficiente material genómico para realizar la prueba.

El control de extracción de ADN genómico es necesario para la confirmación de un resultado verdadero negativo. Este control informa de la presencia de ADN del paciente en la muestra, aunque no haya habido amplificación de ninguna mutación.

El control interno de amplificación permite distinguir entre los casos de inhibición de la reacción de PCR y aquéllos en los que no se encontró ADN en la muestra.

El software podría ofrecer un resultado **“NO DNA”**:

- Extracción no válida: La presencia de inhibidores o un fallo en la extracción de la muestra, no permite la amplificación de las mutaciones y/o del control de extracción, para resolverlo es necesario repetir todo el proceso desde la extracción de la muestra.

El software podría ofrecer un resultado **“PCR INHIBIDA”**:

- Amplificación no válida: La ausencia de amplificación en uno de los tubos y presencia de amplificación en otros tubos, indicará que se ha realizado una correcta extracción pero que ha habido un fallo en la amplificación de alguno de los tubos, para resolverlo se deben amplificar de nuevo los tubos correspondientes y continuar el proceso.

El software podría ofrecer un resultado **“NO CONCLUYENTE”**:

- En aquellos casos en que las lecturas de absorbancia de las réplicas de una sonda del array sean muy distintas entre sí.
- En aquellos casos en los que aparezcan más de tres mutaciones como positivas debido a un fallo en el tubo de PCR, para resolverlo es necesario repetir todo el proceso desde la amplificación.
- En el caso de la mutación L858R en el que la señal obtenida está en el límite de detección para la mutación. Se aconseja repetir todo el análisis desde nueva muestra.

El software podría ofrecer un resultado **“ANÁLISIS NO VÁLIDO”**:

- Revelado bajo: En aquellos casos en los que el software detecta una baja señal del revelado, para resolverlo se debe repetir el análisis desde la visualización.

10. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO

10.1 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 o degradación del ADN), 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 5, 6 y 7 de este manual.

10.2 Especificaciones técnicas:

Parámetros Analíticos:

- **Sensibilidad analítica.** La sensibilidad analítica se ha determinado mediante la amplificación de diluciones seriadas de ADN de plásmidos recombinantes para cada una de las mutaciones que detecta el kit (Tabla 6). Dicha sensibilidad también se ha determinado mediante la amplificación de diluciones seriadas de líneas celulares fragmentadas en tamaños de alrededor de 160 pares de bases, que contienen la mutación a determinar en diferentes porcentajes (5%, 3%, 2%) (Tabla 7). La visualización se realizó en CS dando lugar a los siguientes resultados:

SENSIBILIDAD ANALITICA: CLONES				
MUTACIÓN	Cop/5 ul	SENSIBILIDAD (%)	REPRODUCIBILIDAD (%)	REPETIBILIDAD (%)
L858R	10 e1	100	100	100
DEL 19	10 e3 - 10 e1	100	100	100
T790M	10 e2	100	100	100
L861Q	10 e2	100	100	100
G719A	10 e2	100	100	100
G719C	10 e1	100	100	100
G719S	10 e3	100	100	100
INS. 20	10 e5 - 10 e2	100	100	100

Tabla 6. Relación del número de copias del plásmido recombinante necesarios para obtener una sensibilidad del 100% en la detección de cada una de las mutaciones.

SENSIBILIDAD ANALITICA: LÍNEAS CELULARES				
MUTACIÓN	% TUMORAL	ng	SENSIBILIDAD (%)	REPRODUCIBILIDAD (%)
L858R	5%	2ng	100	100
	3%	2ng	100	100
	2%	5ng	100	100
DEL19	5%	2ng	100	100
	3%	5ng	100	100
	2%	10ng	100	100
T790M	5%	10ng	100	100
	3%	10ng	100	100
	2%	10ng	100	100

Tabla 7. Relación de nanogramos de línea celular con diferentes porcentajes tumorales (5%, 3%, 2%) necesarios para obtener una sensibilidad del 100% en la detección de cada una de las mutaciones.

- **Especificidad analítica.** Se llevaron a cabo experimentos de especificidad con plásmidos recombinantes y líneas celulares, observándose que no se produce detección inespecífica de otras mutaciones diferentes a la que se quiere determinar. Por tanto, se considera que la técnica alcanza una especificidad analítica del 100 %.

Parámetros de utilidad diagnóstica:

Para determinar los parámetros diagnósticos del kit, se realizó una evaluación comparativa del **kit CLART® CMA EGFR LB** con diferentes técnicas de referencia:

- Se generaron librerías con amplicones de los exones 18, 19, 20, y 21 del gen EGFR empleando paneles diseñados por ThermoFisher Scientific. Las muestras se cargaron en el chip 316™ (ThermoFisher Scientific) y se secuenciaron con el Ion Personal Genome Machine (**Ion PGM™ System** de ThermoFisher Scientific) mediante la tecnología de Ion Torrent. Se fijó una profundidad media de 15.000 lecturas para asegurar la robustez del resultado. Para la técnica se recomienda añadir 10ng de ADN libre circulante. En todas aquellas muestras en las que no se obtuvieron 10ng en la extracción, se añadieron 6 µl, siendo éste volumen, el máximo que admite la técnica.
- Parte de las muestras se analizaron mediante PCR digital (dPCR, del inglés: digital Polymerase Chain Reaction) con el equipo QuantStudio™ 3D Digital PCR System 20K (ThermoFisher Scientific). Se empleó el Chip kit V2 (ThermoFisher Scientific).
- Las muestras de biopsia sólida se analizaron con los kits de Cobas® EGFR Mutation Test v2 (Roche), Therascreen® EGFR RGQ PCR Kit (Quiagen) y CLART® CMA EGFR (GENOMICA).

La sensibilidad de **CLART® CMA EGFR LB** se establece cuando la proporción de cadenas de ADN mutadas están por encima del 2-3% del total, de tal forma que por debajo de estos niveles la sensibilidad de la técnica está disminuida, pudiendo detectarse positivos pero no en el 100% de los casos.

En total se analizaron 53 muestras, gracias a la colaboración de los siguientes laboratorios:

- ✓ Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España.
- ✓ Departamento de Oncología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España.

- ✓ Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, España.
- ✓ Departamento de Oncología del Hospital Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, España.
- ✓ Departamento de Oncología del Hospital Puerta de Hierro, Madrid, España.

Los resultados obtenidos del análisis de las 53 muestras se detallan en la Tabla 8.

N: 53	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
L858R (13)	100%	100%	100%	100%
DEL. 19 (8)	100%	100%	100%	100%
T790M (5)	80%	100%	100%	98%
L861Q (0)	NV	100%	NV	100%
G719A (0)	NV	100%	NV	100%
G719C (0)	NV	100%	NV	100%
G719S (0)	NV	100%	NV	100%
INS. 20 (0)	NV	100%	NV	100%

Tabla 8. Sensibilidad y especificidad diagnóstica de la técnica **CLART® CMA EGFR LB** para cada mutación. VPP: Valor Predictivo Positivo (VP/VP+FP). VPN: Valor Predictivo Negativo (VN/VN+FN). Sensibilidad: VP/VP+FN. Especificidad: VN/VN+FP. VP: Verdadero positivo. FN: Falso negativo. FP: Falso positivo. VN: Verdadero negativo. NV: no valorable.

Teniendo en cuenta que el límite de detección para **CLART® CMA EGFR LB** es de 2-3% de cadenas mutadas en la muestra, se determinan los datos diagnósticos de la siguiente manera:

- Verdaderos positivos: se considera una muestra verdadero positivo si el resultado positivo obtenido con **CLART® CMA EGFR LB** coincide con un dato positivo obtenido por NGS (presencia de cadenas mutadas >2%) o dPCR (presencia de cadenas mutadas >2%), o biopsia sólida positiva para mutaciones activadoras.
- Verdaderos negativo: se considera una muestra verdadero negativo si el resultado negativo obtenido con **CLART® CMA EGFR LB** coincide con un resultado positivo obtenido por NGS con presencia de cadenas mutadas <2% o negativo, o coincide con un resultado positivo obtenido por dPCR con presencia de cadenas mutadas <2% o negativo.

Reproducibilidad diagnóstica. La reproducibilidad diagnóstica se ha obtenido procesando las muestras desde el material preamplificado a partir del ADN libre circulante hasta la visualización en el array del material amplificado. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.

	% homología
Reproducibilidad (n=45)	94.82

Tabla 9. Reproducibilidad diagnóstica del kit *CLART® CMA EGFR LB*.

11. BIBLIOGRAFÍA

Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J. (2014). **Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies.** *Sci Transl Med.* 19; 6(224): 224ra24

Diaz Jr. L. A. and Bardelli A. (2014). **Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA.** *Clin Oncol* 32:579-586.

Imamura F., Uchida J., Kukita Y., Kumagai T., Nishino K., Inoue T., Kimura M., Oba S., Kato K. (2016). **Monitoring of treatment responses and clonal evolution of tumor cells by circulating tumor DNA of heterogeneous mutant EGFR genes in lung cancer.** *Lung Cancer.* 94:68-73.

Karachaliou N., Mayo-de las Casas C., Queralt C., de Aguirre I., Melloni B., Cardenal F., Garcia-Gomez R., Massuti B, Sánchez J.M., Porta R., Ponce-Aix S., Moran T., Carcereny E., Felip E., Bover I., Insa A., Reguart N., Isla D., Vergnenegre A., de Marinis F., Gervais R., Corre R., Paz-Ares L., Morales-Espinosa D., Viteri S., Drozdowskyj A., Jordana-Ariza N., Ramirez-Serrano J.L., Molina-Vila M.A., Rosell R. (2015). **Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial.** Spanish Lung Cancer Group. *JAMA Oncol.* May;1(2):149-57.

Luke J.J., Oxnard G.R., Paweletz C.P., Camidge D. R., Heymach J.V., Solit D.B., Johnson B.E. (2014) **Realizing the Potential of Plasma Genotyping in an Age of Genotype-Directed Therapies.** *JNCI J Natl Cancer Inst.* 106(8).

Marchetti A., Palma J.F., Felicioni L., De Pas T.M., Chiari R., Del Grammastro M., Filice G., Ludovini V., Brandes A. A., Chella A., Malorgio F., Guglielmi F., De Tursi M., Santoro A., Crinò L., and Buttitta F. (2015). **Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of EGFR Mutations in Plasma of NSCLC Patients.** *J.of Thoracic Oncology* ®, 10 (10).

Mok T., Wu Y.-L., Lee J.S., Yu C-J, Sriuranpong V., Sandoval-Tan J., Ladrera G., Thongprasert S., Srimuninnimit V., Liao M., Zhu Y., Zhou C., Fuerte F., Margono B., Wen W., Tsai J., Truman M., Klughammer B., Shames D.S., and Wu L. (2015). **Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy.** *Clin Cancer Res;* 21(14).

Schwaederle M., Husain H., Fanta P.T., Piccioni D.E., Kesari S., Schwab R.B., Patel S.P., Harismendy O., Ikeda M., Parker B.A., Kurzrock R (2016). **Use of Liquid Biopsies in Clinical Oncology: Pilot Experience in 168 Patients.** *Clin. Cancer Res.* pii: clincanres.0318.2016.

Sorensen B.S., Wu L., Wei W., Tsai J., Weber B., MD, Nexo E., and Meldgaard P. (2014). **Monitoring of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor-Sensitizing and Resistance Mutations in the Plasma DNA of Patients**

With Advanced Non–Small Cell Lung Cancer During Treatment With Erlotinib. Cancer, 120(24):3896-901.

Thress K.S., Brant R., Carr T.H., Dearden S, Jenkins S, Brown H., Hammett T., Cantarini M., Barrett J.C. (2015). **EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291.** Lung Cancer. 90(3):509-15.

Qiu M, Wang J, Xu Y, Ding X, Li M, Jiang F, Xu L, Yin R. (2015). **Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis.** Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 24(1):206-12.