



CLART® CMA
KRAS·BRAF·PI3K

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE MUTACIONES PUNTUALES
EN TRES GENES DE LA RUTA DEL EGFR ASOCIADOS A CÁNCER COLORRECTAL
–KRAS, BRAF y PI3K-
PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO***

CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K

CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K está bajo la protección de 2 familias de patentes correspondientes a las solicitudes de Patente Internacional PCT WO2013092839 y WO2014044828. Dichas familias comprenden patentes y solicitudes de patente en los siguientes territorios: Europa, USA, Canadá, Brasil, México y China.

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

Para ampliar la información descrita en este manual puede consultar la siguiente página web: www.genomica.com



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



Versión 13.1
Febrero 2018

Contenido

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	5
2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN	6
3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT	9
3.1. Reactivos de amplificación	9
3.2. Componentes de visualización	9
3.3 Otros componentes	10
4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS.....	12
4.1. Reactivos y material	12
4.2. Equipos	12
5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN	13
6. MUESTRAS	14
7. PROTOCOLO DE TRABAJO.....	14
7.1. Pretratamiento de la muestra	14
7.2. Extracción de material genético	15
7.2.1. Recomendaciones específicas para la extracción y adición de material extraído al tubo de amplificación	15
7.2.2. Método de extracción	16
7.3. Reacción de Amplificación.....	17
7.3.1. Recomendaciones específicas para la amplificación.....	17
7.3.2. Protocolo de Amplificación	17
7.4. Visualización del producto amplificado.....	18
7.4.1. Recomendaciones específicas para la visualización.....	18
7.4.2. Protocolo de visualización manual	21
7.4.3. Protocolo de visualización en autoclart®	23
8. RESULTADOS.....	26
9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO.....	27
9.1. Control de interferencias conocidas.....	27
9.2. Especificaciones técnicas.....	27
9.2.1. Parámetros analíticos	27
9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica.....	28
10. REFERENCIAS	30

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS



Atención, ver instrucciones de uso



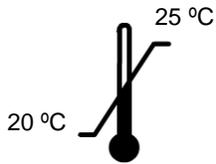
Fecha de caducidad



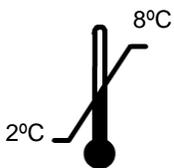
Producto sanitario para Diagnóstico *In Vitro*



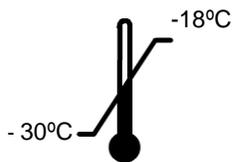
Lote



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 KRAS·BRAF·PI3K detecta las mutaciones puntuales más prevalentes en la ruta del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, EGFR (del inglés Epidermal Growth Factor Receptor), asociadas a cáncer colorrectal. Las mutaciones puntuales detectadas por el kit son las siguientes:

KRAS: G12A
G12C
G12D
G12R
G12S
G12V
G13D
Q61H
Q61L

BRAF: V600E
V600K

PI3K: E542K
E545D
E545K
H1047R

Material de partida: Biopsias colorrectales FFPE (tejido embebido en parafina fijado con formaldehído) (ver Apartado 6).

La detección está basada en nuestra tecnología CLART®: Una amplificación por PCR multiplex a tiempo final, específica de mutación y que origina un fragmento variable para cada mutación de entre unos 100-200 pares de bases, seguida de visualización en microarray de baja densidad.

Los tubos de amplificación a emplear dependerán del gen o genes a analizar:

- Mutaciones puntuales de KRAS: 3 tubos de amplificación diferenciados por su color: (i) blanco con la máster mix coloreada en verde, (ii) blanco con la máster mix incolora y (iii) rojo.
- Mutaciones puntuales de BRAF: 1 tubo de amplificación de color amarillo.
- Mutaciones puntuales para PI3K: 2 tubos de amplificación de color azul y blanco.

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.

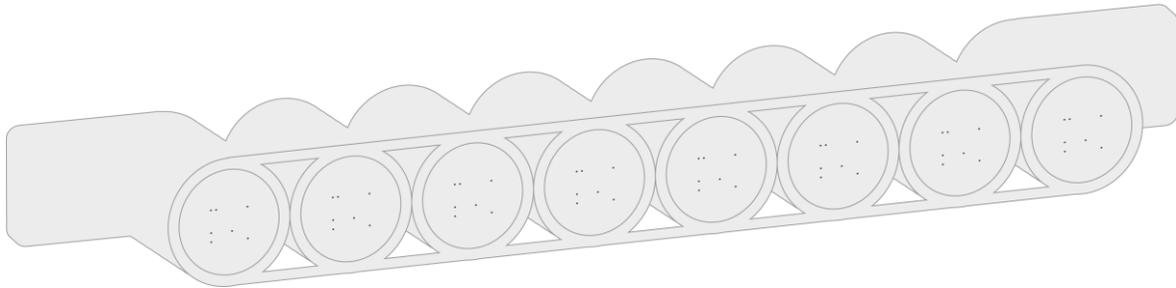


Figura 1. CLART-Strip® en forma de tira de 8 pocillos.

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 secuenciales: 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.

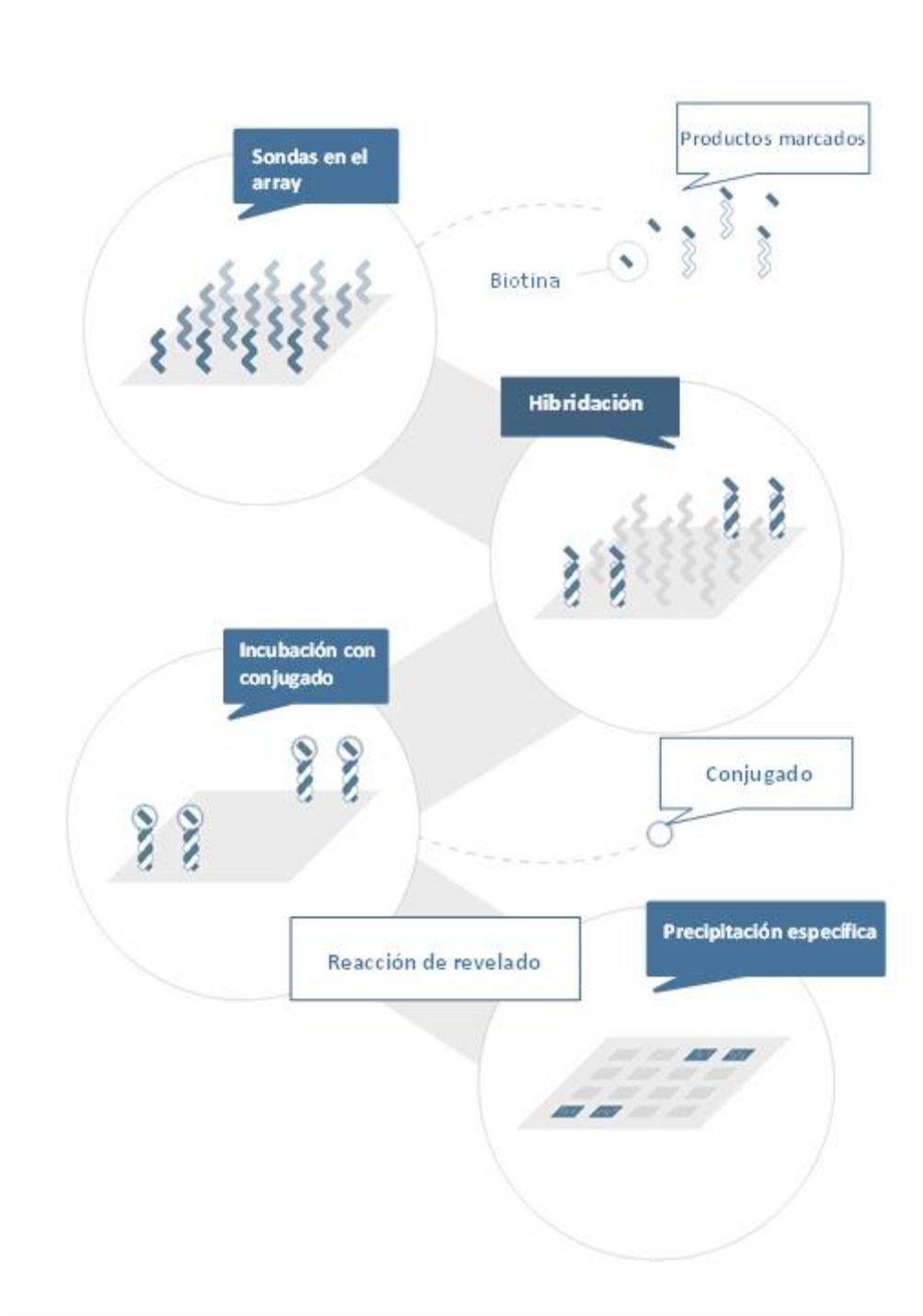


Figura 2. Esquema del Sistema de detección. Las sondas inmovilizadas en la superficie del microarray capturan sus respectivos productos de amplificación complementarios, marcados con biotina. A continuación tiene lugar la unión de la biotina con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguida de una 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

El kit **CLART® CMA KRAS-BRAF-PI3K** contiene suficientes reactivos para el análisis de 8 ó 24 muestras clínicas. 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.

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.

Tubos de amplificación que se envían según el gen a analizar:

- **GEN KRAS (mutaciones G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D, Q61H y Q61L):**

3 tubos de amplificación: Mix 1: Tubo blanco con la máster mix coloreada en verde; Mix 2: Tubo blanco con la máster mix incolora; y Mix 3: Tubo rojo.

- **GEN BRAF (mutaciones V600E y V600K):**

1 tubo de amplificación: Mix 1: Tubo amarillo.

- **GEN PI3K (mutaciones E542K, E545D, E545K y H1047R):**

2 tubos de amplificación: Mix 1: Tubo blanco; Mix 2: Tubo azul.

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 todas las mutaciones a detectar.

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.

En caso de que se quiera visualizar un número de muestras más reducido, los CS de 8 pocillos se enviarán en formato pre-cortado, el cual permite cortar la tira por la mitad y visualizar las muestras en múltiplos de cuatro. En este caso se enviará también un Adaptador de placa Microtiter reutilizable, junto con un sistema de piezas magnéticas para insertar las tiras cortadas (ver figura 3).

- **SH (Solución de Hibridación). Conservar a temperatura ambiente**

- Envío y almacenaje a 4°C:

- **DC (Diluyente de Conjugado).**
- **CJ (Solución de Conjugado).** Dar un pulso en la centrífuga antes de usar.
- **RE (Solución de Revelado).** Conservar protegida de la luz.
- **TL (Tampón de Lavado).**
- **Adaptador de placa Microtiter y tapa de plástico.**

3.3 Otros componentes

- Placa Microtiter y sistema de imanes adaptadores para insertar los CS cortados en formato de cuatro pocillos (Figura 3).

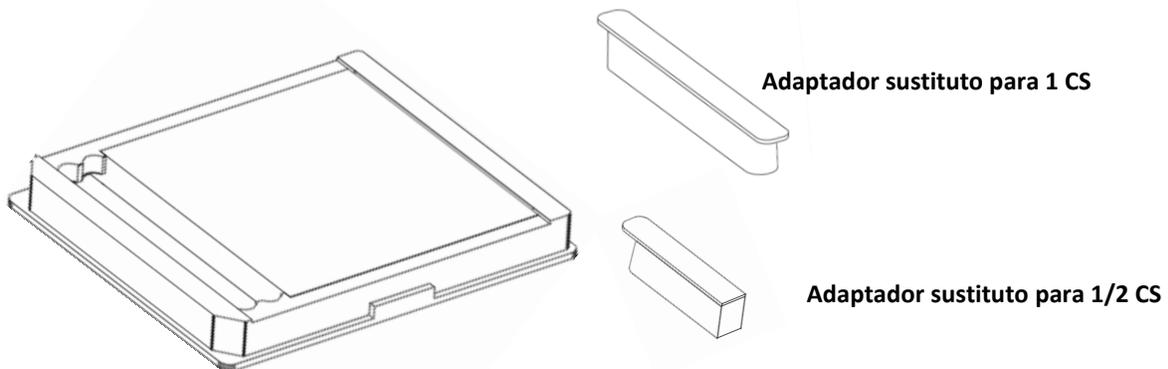


Figura 3. Placa Microtiter y sistema de adaptadores magnéticos para visualización de muestras en múltiplos de cuatro.

- 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 4. CAR[®] (CLINICAL ARRAY READER)

- **autoclart**[®] de GENOMICA.

Posibilita el procesamiento automático de hasta 12 tiras de **CSs** (96 muestras) durante la fase de visualización.

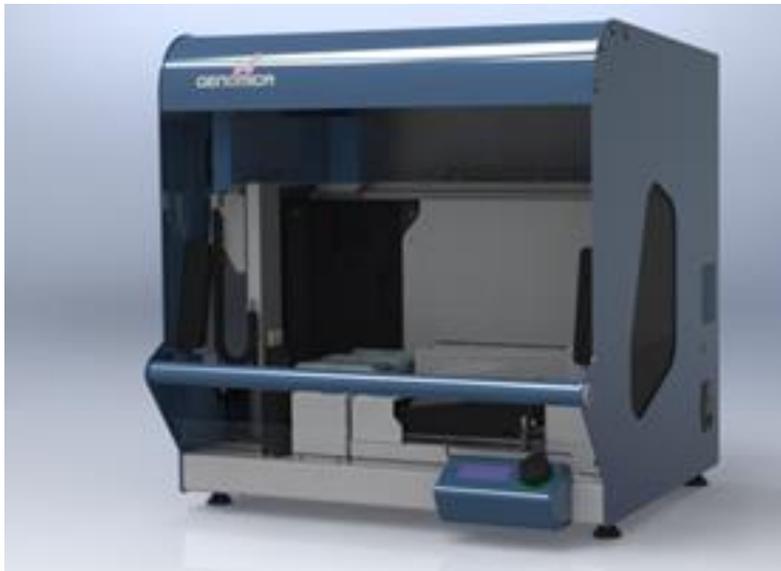


Figura 5. autoclart[®]

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 0.2 mL.

4.2. Equipos

- Microcentrífuga.
- Espectrofotómetro de UV-visible.
- Termociclador convencional. No rampas rápidas.
- Cabina de seguridad biológica.
- 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 entre 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 KRAS-BRAF-PI3K ha de ser llevada a cabo en dos áreas separadas físicamente, con el fin de minimizar contaminaciones de la muestra:

Área pre-PCR. En este lugar se lleva a cabo la preparación de las muestras, la extracción del ADN y la adición de material extraído a los tubos de amplificación. Es obligatorio el uso de una cabina de seguridad biológica, y el empleo de medidas de esterilidad lo más estrictas posible para evitar contaminaciones.

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 las áreas 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 ADN a los tubos de amplificación.

3. Limpie en profundidad las áreas de trabajo empleadas (poyata, cabinas, 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.

4. 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.

5. Use material de laboratorio desechable y autoclavado.

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

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

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

9. GENOMICA no se hace responsable de los resultados obtenidos con el kit si se emplean condiciones distintas a las indicadas.

6. MUESTRAS

El kit **CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K** ha sido diseñado y validado para el uso a partir de material genético de biopsias de cáncer colorrectal.

GENOMICA no se responsabiliza de los resultados si se utilizan otro tipo de muestras.

7. PROTOCOLO DE TRABAJO

El kit **CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K** ha sido validado utilizando dos protocolos distintos de pre-tratamiento de la muestra.

7.1. Pretratamiento de la muestra

Procesado previo

Los cortes de FFPE (tejido embebido en parafina fijado con formaldehído) deben colocarse en un portaobjetos de vidrio para la exploración por parte del patólogo. Cada muestra debe procesarse mediante un bisturí estéril nuevo.

El patólogo hará un estudio de cada corte y, con la ayuda de la tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E), podrá delimitar y verificar el área tumoral mediante un porcentaje (%) de células tumorales. A continuación, se seguirán las siguientes instrucciones:

- Si existe un porcentaje <50% de células tumorales y un área pequeña: tomar 6 secciones de 10 µm.
- Si existe un porcentaje >50% de células tumorales y un área grande: tomar 2-4 secciones de 10 µm.
- Si existe una gran cantidad de tejido, indistintamente del porcentaje tumoral: cortar 1 sección de 10 µm.
- En caso de biopsias endoscópicas (muy pequeñas) cortar 10 secciones de 10 µm.

Incluir los cortes en un tubo de 1.5ml.

A continuación, elegir uno de estos dos protocolos:

PROTOCOLO 1.

1. Añadir 1 ml de Xileno al tubo con la muestra, dar un vórtex durante 5 segundos.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Centrifugar el tubo a 13.200 rpm, 5 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante.
5. Añadir 1ml de Etanol al 96-99% dar un vórtex durante 5 segundos.

6. Centrifugar el tubo con la muestra a 13.200rpm durante 2 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante.
8. Incubar a 56°C para evaporar los restos de sobrenadante (pellet seco), aproximadamente durante 15 minutos.
9. Seguir en este paso el protocolo indicado en el manual del kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit de Qiagen. Eluir en un volumen final de 50µl.

PROTOCOLO 2.

Día 1.

1. Centrifugar el tubo con la muestra durante 1 minuto a 13.200 rpm, para que se concentren los cortes de la muestra en el fondo del tubo.
2. Calentar la muestra, sin agitación, a 5 minutos 75° en el thermomixer.
3. Añadir a cada muestra 190µl de buffer G2 (de lisis) del kit EZ1 DNA Tissue Kit de Qiagen.
4. Incubar 5 minutos a 75°C en agitación a 1400 rpm.
5. Bajar la temperatura del thermomixer a 56°C.
6. Añadir 25 µl de proteinasa K preparada según el kit antes mencionado (20 mg/ml).
7. Incubar toda la noche a 56°C en agitación a 1.400 rpm.

Día 2.

1. Añadir 10µl de proteinasa K, y dar un vórtex.
2. Incubar toda la noche a 56°C en agitación a 1.400 rpm.

Día 3.

1. Centrifugar el tubo con la muestra 1 minuto a 13.200 rpm.
2. Añadir 2 µl de glicógeno a 20 mg/ml (opcional, adecuado en muestras con poco material de extracción previo).
3. Recoger el sobrenadante.
4. Homogeneizar la muestra con pipeta en el caso de que queden restos de tejido.
5. Pipetear el sobrenadante en un tubo de extracción específico dispuesto por el Kit de Extracción de la casa Qiagen para muestras embebidas en parafina.
6. Poner en BIO-ROBOT EZ1, para proceder a la extracción de DNA. La tarjeta ha de ser “DNA parafina”, y el volumen de elución ha de ser de 50 µl.

7.2. Extracción de material genético

7.2.1. Recomendaciones específicas para la extracción y adición de material extraído al tubo de amplificación

1. Utilizar guantes en todo momento.

2. Limpiar las superficies de trabajo de la cabina con lejía diluida al 10%.
3. Encender el flujo laminar y la luz UV al menos 20 minutos antes de comenzar la extracción. Apagar la luz UV cuando se esté trabajando dentro de la cabina.
4. La preparación de las muestras antes de su extracción, debe hacerse dentro de la cabina.

7.2.2. Método de extracción

Se puede emplear cualquier método de extracción que garantice los siguientes parámetros de concentración y pureza:

1. La concentración del material genético añadido al tubo de PCR debe ser 150ng totales. Un exceso o defecto de ADN puede dar lugar a un diagnóstico erróneo.

No sobrepasar nunca los 150 ng totales ni 10 μ l de volumen añadido a cada tubo de PCR (se debe añadir de 5 a 10 microlitros de ADN extraído a cada tubo de amplificación en función de la concentración).

A continuación se muestra una tabla resumen con todas las posibilidades que pueden encontrarse:

ADN extraído (ng/ μ l)	Volumen (μ l) a añadir a cada tubo de PCR	Cantidad total (ng) de ADN añadido a cada tubo de PCR
30	5	150
25	6	150
21.5	7	150
19	8	150
17	9	150
15	10	150

Si la concentración es inferior a 15 ng/ μ l se debe volver a extraer la muestra.

2. El ADN extraído debe tener la siguiente pureza suficiente para evitar un diagnóstico erróneo: La medida del ratio entre la absorbancia a 260nm y la absorbancia a 280nm debe ser cercana a 2. Si la pureza no es la adecuada se debe volver a extraer.
3. El material extraído debe conservarse a 4°C si se va a procesar inmediatamente o a -20°C en caso contrario.

Es importante incluir un control negativo de extracción 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.

7.3. 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.
- Añadir el ADN siempre en cabina. Durante el proceso mantener los tubos separados y en hielo.
- Uso exclusivo en termocicladores convencionales que tengan velocidad de rampa de enfriamiento/calentamiento de, como máximo, 2-3°C por segundo, y bloque de aluminio. No usar termocicladores de rampas rápidas. En algunos modelos de termocicladores de rampas rápidas se puede reducir la velocidad de las rampas a 3°C por segundo. Este kit ha sido validado en dos modelos de termociclador que cumplen estos requisitos: Mastercycler® Nexus (Eppendorf), Applied Biosystems 2720.
- Colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando el bloque haya sobrepasado la temperatura de 95°C.

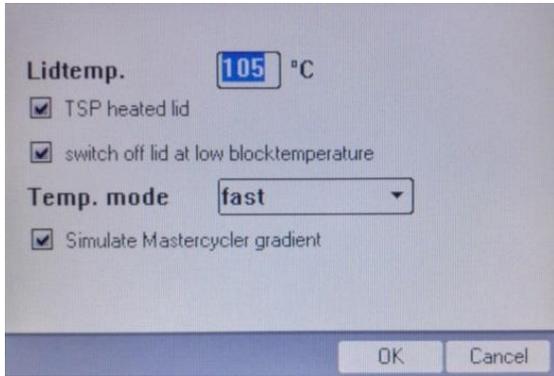
7.3.2. Protocolo de Amplificación

1. Descongelar a 4°C el número de tubos de amplificación necesario según los genes que se vayan a analizar (entre 1 y 6 tubos).
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. Añadir a cada tubo de amplificación 5-10 µL de ADN extraído previamente conforme a las directrices de la sección 7.3.1, y resuspender varias veces con la micropipeta. Mantener los tubos a 4°C.
4. Programar en el termociclador los correspondientes ciclos de temperaturas. Proceder de la manera que se indica más abajo, en función del modelo de termociclador que se vaya a emplear:

A. Modelo Mastercycler® Nexus (Eppendorf) o modelos con rampa de calentamiento de 3°C/seg y de enfriamiento de 2°C/seg. y bloque de aluminio:

1 ciclo	99°C 10 min
40 ciclos	94°C 40 seg 62°C 60 seg
1 ciclo	72°C 10 min
4°C continuo hasta la recogida de tubos	

Muchos de estos termocicladores presentan diferentes opciones de PCR. En caso de que exista esta modalidad, seleccionar la opción “fast”, tal y como se indica a continuación para el modelo Mastercycler® Nexus y Simulate Mastercycler gradient.



B. Modelo Applied Biosystems 2720, o modelos con una rampa de calentamiento y enfriamiento de 2,7 °C /sec y bloque de aluminio:

1 ciclo	99°C 10 min
40 ciclos	94°C 40 seg 62°C 60 seg
1 ciclo	72°C 10 min
4°C continuo hasta la recogida de tubos	

5. Iniciar el programa y colocar los tubos en el termociclador cuando el bloque haya alcanzado sobrepasado los 95°C. De este modo se minimizan las posibles amplificaciones inespecíficas debidas a incubación por debajo de la temperatura de hibridación.

El producto amplificado debe visualizarse en un plazo máximo de cinco días, para evitar la degradación del mismo. Conservar a 4°C hasta su uso.

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 el área de pre-PCR.
2. 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.
3. 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 min. de desnaturalización.

4. El producto de PCR solo debe ser desnaturalizado una vez para su hibridación. No emplear para la visualización producto de PCR que haya sido desnaturalizado más de una vez. Si fuera necesario, hacer alícuotas previamente al paso de desnaturalización.
5. En caso de que se quiera realizar visualización en un número de muestras múltiplo de cuatro, se cortará la tira CS por la mitad, haciendo presión con los dedos índice y pulgar en el sentido de las flechas, tal y como se indica en la figura 6. Los “medios CS” se insertarán en la placa Microtiter con el sistema de adaptadores magnéticos, tal y como se indica en la figura 7. Existen otras posibles formas de adaptar los CS en la placa Microtiter, las cuales vienen indicadas en la superficie del mismo.

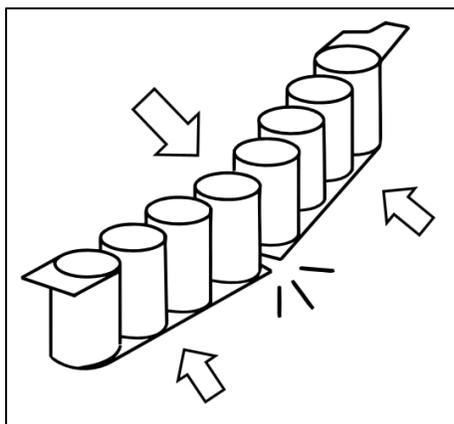


Figura 6: Esquema de corte de los CS

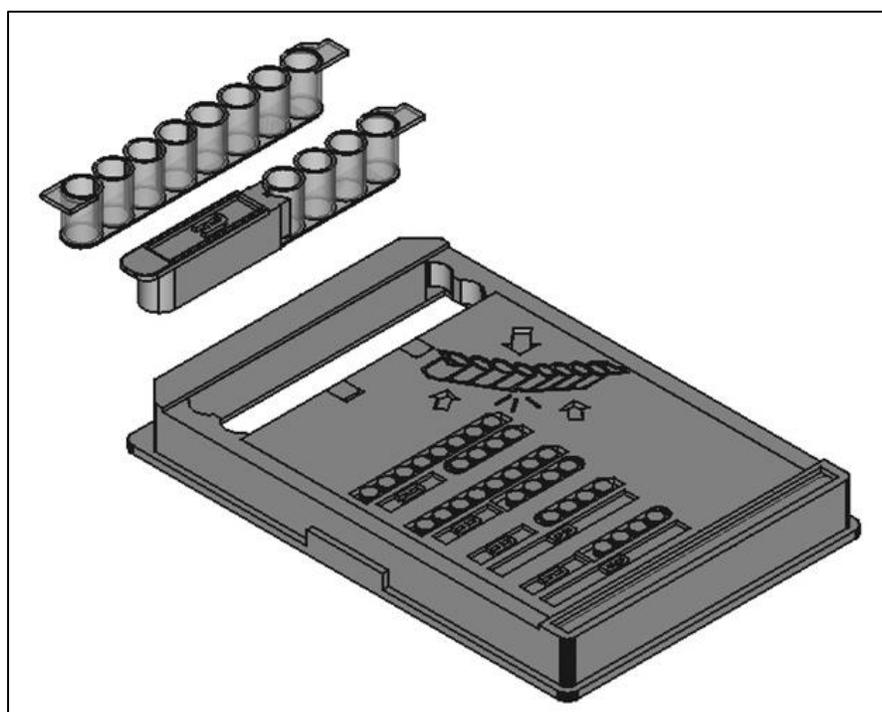


Figura 7: Esquema para insertar los CS en la placa Microtiter

6. El array no debe quedarse totalmente seco en ningún momento hasta su lectura.
7. 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.
8. Se recomienda añadir cada solución sobre la pared del pocillo CS, nunca directamente sobre el fondo.
9. 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 desnaturalizados de PCR; por tanto mantener dicha solución de hibridación a 50°C hasta que sea añadida.
10. Asegurarse de que antes de comenzar la hibridación, el thermomixer de placas ha estado a 50°C durante al menos 60 minutos.
11. Tras la incubación con la solución CJ, es muy importante lavar bien el microarray para evitar que queden restos de éste y que reaccionen con la solución RE, produciendo un precipitado inespecífico que pueda dar lugar a interpretaciones erróneas del resultado.
12. Evite burbujas sobre la superficie del microarray al añadir cualquiera de las distintas soluciones.
13. Encender el CAR® antes de iniciar todo el proceso. La auto-calibración del equipo puede durar unos minutos.
14. Preparar TL diluido inmediatamente antes de su uso; no reutilizar soluciones preparadas con anterioridad.
15. Durante la visualización no hace falta usar puntas con filtro, pero sí utilizar una punta diferente para cada pocillo y cambiarla cada vez que se añada un reactivo, incluso aunque se trate de TL.
16. Durante la adición de material amplificado a los pocillos del CS sí es necesario utilizar puntas con filtro.
17. 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.

18. 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.
19. 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 manual

1. Desnaturalización de los productos de amplificación: Colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando éste haya alcanzado 95°C, e incubar a 95°C **durante 8 minutos**. 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 TL diluido, diluyendo 1 mL de TL en 9 mL de agua destilada. Agitar suavemente.
3. Prelavado de los CS: Colocar los **CS** necesarios en el adaptador de placa microtiter. Añadir 200 µL de TL diluido 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, y mantener la solución de lavado en los **CS** hasta la adición de los dichos productos. Desechar la solución de lavado con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío.

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

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

Añadir **al mismo pocillo del CS**, los siguientes volúmenes de producto de PCR desnaturalizado correspondientes a los tubos de amplificación que se hayan utilizado para una misma muestra:

Mix 1 KRAS: 5 µL

Mix 2 KRAS: 5 µL

Mix 3 KRAS: 10 µL (tubo rojo)

Mix 1 BRAF: 5 µL

Mix 1 PI3K: 5 µL

Mix 2 PI3K: 5 µL

Es condición indispensable para la correcta interpretación de los resultados visualizar todos los tubos de la misma muestra en el mismo pocillo del CS aunque sean genes distintos.

Resuspender la solución varias veces, 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 el adaptador de placa microtiter y los **CSs** con la tapa de plástico, e incubar en el thermomixer durante 60 minutos a 50° C, y 550 rpm.

Después de la incubación, retirar la placa del thermomixer y aspirar la solución de incubación de los pocillos del CS con pipeta o bomba de vacío. El CS debe quedar sin restos de solución. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

Programar el thermomixer a 20°C para su uso posterior en el paso 6 de más abajo. Para un descenso más rápido de la temperatura, se puede quitar la tapa.

5. Doble lavado: Añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo de 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar la solución de lavado con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío multicanal. Repetir. Usar puntas diferentes para cada pocillo en ambos lavados. Mantener las muestras en la solución de lavado hasta que el thermomixer alcance 20°C.
6. Bloqueo y conjugado: Centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación preparar la Solución CJ diluida. Para ello añadir **15 µL de CJ en 1 mL de DC** (cantidades adecuadas para un **CS**). Esta solución se debe de preparar 5 minutos antes de finalizar el tiempo de la hibridación.

Aspirar el TL diluido de los pocillos sin dejar ningún resto, y añadir **100 µL** de Solución CJ diluida a cada pocillo. Incubar durante **30 minutos exactos en el thermomixer de placa a 20°C y 550 rpm**. Tras esta incubación, sacar la placa y retirar la solución rápidamente con pipeta o bomba de vacío multicanal. Dejar programado el thermomixer a 25°C sin agitación para su utilización posterior en el paso 8. Para un descenso más rápido de la temperatura, se puede quitar la tapa.

7. Triple lavado: Inmediatamente después del paso 6, añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar el TL diluido con la pipeta o 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.
8. Revelado: Eliminar por completo el TL diluido 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** (Asegúrese de que el thermomixer ha alcanzado 25⁰ C y de que se emplea sin agitación).

Retirar completamente la solución RE usando pipeta o 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.

7.4.3. Protocolo de visualización en autoclart®

1. Encender el CAR® antes de iniciar todo el proceso. La auto-calibración del equipo puede durar unos minutos.
2. Desnaturalización de los productos de amplificación: Colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando éste haya alcanzado 95°C, e incubar a 95°C durante 8 minutos. A continuación, sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo.

Este paso ha de ser previo antes de preparación de los reactivos de visualización en el autoclart®

3. Encender el equipo autoclart® y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla.
4. Cerrar la puerta y pulsar el mando.
5. Seleccionar “Run” en el menú de inicio.
6. Seleccionar el tipo de ensayo a realizar: **CMA**.
7. Seleccionar el pocillo de la tira en el que se desea comenzar: A1 o E1, éste último en el caso de que se reutilice un CS donde se hayan procesado previamente los 4 primeros pocillos.
8. 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.
9. Verificar que el número de muestras y el pocillo de inicio (A1 o E1) indicados son correctos.
10. Colocar el rack completo de puntas en su posición correspondiente.
11. Chequear que el contenedor de puntas y el contenedor de desecho de reactivos están vacíos.
12. Llenar la botella de agua destilada con 250 ml de agua destilada.

13. Añadir los volúmenes de reactivos que autoclart® solicita en función del número de muestras que se quieran procesar:

TL. El volumen que aparece en la pantalla indica la cantidad de TL diluido necesaria. Para prepararlo realizar una dilución 1:10 de TL en agua destilada.

CJ. Centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación preparar la Solución CJ diluida que indique la pantalla. Para ello añadir 15 µL de CJ en 1 mL de DC (cantidades adecuadas para un CS). Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

RE. Añadir el volumen de RE indicado en la pantalla.

SH. Añadir el volumen de SH atemperada a 50°C 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.

14. Cerrar la puerta y pulsar el mando para comenzar. El equipo realizará el pre-lavado de los CS y la adición de SH; 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.

15. Para añadir las muestras, sacar los CSs del autoclart® y añadir los siguientes volúmenes de producto amplificado desnaturalizado de cada uno de los tubos correspondientes a una misma muestra, a un mismo pocillo del CS:

Mix 1 KRAS: 5 µL

Mix 2 KRAS: 5 µL

Mix 3 KRAS: 10 µL (tubo rojo)

Mix 1 BRAF: 5 µL

Mix 1 PI3K: 5 µL

Mix 2 PI3K: 5 µL

Resuspender varias veces para que se mezcle con SH, 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.

16. 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®.

ADVERTENCIA: Una vez finalizada la visualización en autoclart® debe procederse de forma inmediata a la lectura de los resultados en el CAR®, en caso contrario, podrían aparecer falsos negativos por pérdida de la intensidad de las sondas.

17. Coloque la placa en el CAR® para tomar las imágenes de todos los pocillos. 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 equipo CAR®.

Para la interpretación correcta de los resultados, la muestra debe ser procesada con todos los tubos de amplificación necesarios para cada gen a analizar, y visualizados en un mismo pocillo del CS.

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

Cada uno de los genes incluidos en el kit, con independencia del número de tubos de amplificación, lleva un control de amplificación y un control de extracción. Ambos controles son necesarios para la validación de los resultados.

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

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

En la Tabla 1, a continuación, se recogen posibles resultados a obtener, así como las interpretaciones y soluciones correspondientes:

Resultado	Explicación	Solución: Repetir...
NO ANALIZADO	<ul style="list-style-type: none"> Extracción no válida: La presencia de inhibidores o un fallo mecánico en la extracción de la muestra, no permite la amplificación de las mutaciones y/o de los controles de amplificación y de extracción 	<ul style="list-style-type: none"> ...todo el proceso.
	<ul style="list-style-type: none"> 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 del primero de ellos 	<ul style="list-style-type: none"> ...amplificación del tubo correspondiente, y continuación con etapas subsiguientes
	<ul style="list-style-type: none"> No inclusión de alguno de los tres genes en el análisis: 	—
NO-CONCLUYENTE	<ul style="list-style-type: none"> Réplicas de una sonda muy distintas entre sí. 	...amplificación y etapas subsiguientes

Tabla 1.

9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO

9.1. Control de interferencias conocidas

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos a una calidad inadecuada del material genético extraído (por insuficiente cantidad de muestra, degradación del ADN, almacenaje incorrecto o pérdida de material genético durante la extracción), o a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras a procesar (alcohol, sales, etc.). Con el kit **CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K** se han eliminado falsos negativos añadiendo a los tubos distintos controles internos de amplificación, que son indicativos de la eficiencia de la reacción de amplificación.

Para evitar estas interferencias, además, deben seguirse las indicaciones que aparecen en las secciones 5, 6 y 7 de este Manual.

9.2. Especificaciones técnicas

9.2.1. 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. Cada uno de ellos lleva inserto el producto amplificado (incluyendo la parte complementaria a las sondas específicas de detección). Dicha sensibilidad también se ha determinado mediante la amplificación de diluciones seriadas de líneas celulares comerciales que contienen la mutación a determinar. La visualización se realizó en CS. Los resultados se muestran en la Tabla 2:

Mutación puntual	Nº copias de plásmido recombinante por reacción de PCR
G12A	100
G12C	1000
G12D	
G12R	
G12S	
G12V	
G13D	
Q61H	

V600E	
V600K	
E542K	
E545D	
E545K	
H1047R	
Q61L	

Tabla 2. Relación del número de copias de plásmido recombinante necesarias 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 15 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%.

9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica

Sensibilidad diagnóstica.

Para determinar los parámetros diagnósticos del kit, se realizó una evaluación comparativa del kit **CLART® CMA KRAS-BRAF-PI3K** con la técnica de referencia (TheraScreen®). Para esta evaluación se colaboró con los centros siguientes:

- Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d’Hebron, Barcelona, España.
- Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, España.
- Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, España.
- Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid, España.

A partir de 250 extraídos de biopsias se analizó la presencia de cada una de las mutaciones de los genes *KRAS* y *BRAF* que se detectan con el kit, y a partir de 58 extraídos de biopsias se analizó la presencia de cada una de las mutaciones en el gen *PI3K*.

Para cada muestra se asume como verdadero el resultado concordante entre la técnica de referencia y **CLART® CMA KRAS-BRAF-PI3K**. En el caso de existir discordancias entre ambas técnicas, se considera como verdadero el resultado de la secuenciación.

Mutación	N=250	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
G12A	18	100,00	100,00	100,00	100,00
G12C	26	88,46	100,00	100,00	98,63
G12D	31	100,00	100,00	100,00	100,00
G12V	29	100,00	100,00	100,00	100,00
G12R	0	ND	100,00	ND	100
G12S	11	90,91	100,00	100,00	99,57
G13D	17	100,00	100,00	100,00	100,00
Q61H	5	100,00	100,00	100,00	100,00
Q61L	0	ND	100,00	ND	100
V600E	66	100,00	99,46	98,51	100,00
V600K	7	100,00	100,00	100,00	100,00
Mutación	N=58	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
E542K	8	100	100	100	100
E545K	9	100	98	89	100
E545D	2	100	100	100	100
H1047R	5	100	98	80	100

Tabla 3. Sensibilidad y Especificidad diagnósticas de la técnica CLART® CMA- KRAS-BRAF.PI3K para cada mutación. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo.

Especificidad diagnóstica.

La técnica se ha validado con un número de 20 muestras negativas para los genes *KRAS* y *BRAF* y 32 muestras negativas para el gen *PI3K*, dando lugar a una especificidad cercana al 100% para todas las mutaciones puntuales.

Repetibilidad y reproducibilidad diagnóstica por tipo de muestra.

Los datos obtenidos son los siguientes:

Para los genes *KRAS* y *BRAF* la Reproducibilidad: 100% (n=39 muestras) y Repetibilidad: 100% (n=35 muestras).

Para el gen *PI3K* la Reproducibilidad: 99,26% (n=45 muestras) y Repetibilidad: 100% (n=30 muestras).

Las muestras de reproducibilidad y repetibilidad se han procesado desde la extracción de la biopsia hasta la visualización en el array del material amplificado.

10. REFERENCIAS

Molecular Mechanisms of resistance to Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer. A Bardelli & S Siena. 2010, *J Clin Oncol*, 28: 1254-61.

Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. S Siena, A Sartore-Bianchi, F Di Nicolantonio, J Balfour, A Bardelli. 2009, *J Natl Cancer Inst*, 101: 1308-24.

Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PI3KCA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. W De Roock, B Claes, D Bernasconi, J De Schutter, B Biesmans, G Fountzilias et al. 2010, *Lancet Oncol*, 11: 753-62.

KRAS, BRAF, PI3KCA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. W De Roock, V De Vriendt, N Normanno, F Ciardiello, S Tejpar. 2011, *Lancet Oncol*, 12: 594-603.