

PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.cobas<sup>®</sup> KRAS Mutation Test

KRAS

24 pruebas

M/N: 05852170190

Consulte el **cobas<sup>®</sup>** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) para obtener información sobre la preparación de las muestras.

**USO PREVISTO**

La prueba **cobas<sup>®</sup>** KRAS Mutation, para uso con el sistema **cobas<sup>®</sup>** 4800, es una prueba de PCR a tiempo real para la detección de mutaciones somáticas en los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS en ADN obtenido de tejido tumoral de cáncer colorrectal (CCR) impregnado en parafina y fijado en formalina. La prueba se ha concebido como ayuda en la identificación de pacientes con CCR que no deberían ser tratados con Erbitux<sup>®</sup> (cetuximab) ni con Vectibix<sup>®</sup> (panitumumab) si se detecta una mutación en el codón 12 o 13 del gen KRAS. No se ha establecido la seguridad y eficacia de Erbitux<sup>®</sup> (cetuximab) o Vectibix<sup>®</sup> (panitumumab) en pacientes que tienen tumores con mutación en el codón 61.

Las muestras se procesan mediante el **cobas<sup>®</sup>** DNA Sample Preparation Kit para la preparación manual de las muestras y el analizador **cobas<sup>®</sup>** z 480 para la amplificación y detección automáticas. La prueba **cobas<sup>®</sup>** KRAS Mutation detecta las siguientes mutaciones del gen KRAS.

Codón	ID de la mutación	Cambio AA	ID de COSMIC
12	c.34G>T	12C	516
	c.34G>A	12S	517
	c.34G>C	12R	518
	c.35G>T	12V	520
	c.35G>A	12D	521
	c.35G>C	12A	522
13	c.38G>A	13D	532
61	c.181C>A	61K	549
	c.181C>G	61E	550
	c.182A>C	61P	551
	c.182A>G	61R	552
	c.182A>T	61L	553
	c.183A>C	61Hc	554
	c.183A>T	61Ht	555

**RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA**

La proteína KRAS es un miembro de la superfamilia de las proteínas G pequeñas. La proteína KRAS actúa como un interruptor que alterna GDP y GTP para transmitir señales extracelulares que influyen en la proliferación celular, la apoptosis y la remodelación del citoesqueleto de actina. Las mutaciones que afectan a los aminoácidos 12 o 13, que se producen en diversos tumores malignos humanos, incluido el cáncer colorrectal (CCR), vinculan la enzima a la unión de GTP en su forma activada, lo que genera una señalización constitutiva que contribuye al proceso oncogénico.<sup>1</sup>

Entre el 24-43 % de los tumores colorrectales presentan mutaciones en el gen KRAS.<sup>2-3</sup> Aunque se han identificado más de 3000 mutaciones puntuales del gen KRAS, la mayoría se producen en los codones 12 o 13 (~82 % en el codón 12 y ~17 % en el codón 13).<sup>4</sup> Las mutaciones en otros codones (p. ej., el codón 61) del gen KRAS son menos comunes (2-3 % de las mutaciones) y, aunque poco frecuentes, se ha demostrado que contribuyen a la activación de KRAS en la misma medida que las mutaciones en los codones 12 y 13.<sup>4</sup>

El cetuximab y el panitumumab son anticuerpos monoclonales cuya diana es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y cuyo uso está aprobado en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Si bien el EGFR se sobreexpresa en el 50-80 % de los tumores colorrectales, la expresión de la proteína EGFR y la amplificación génica sólo presentan un valor predictivo limitado a la hora de determinar la probabilidad de respuesta al cetuximab o al panitumumab.<sup>5</sup>

No obstante, actualmente existen pruebas sólidas que demuestran que la presencia de mutaciones en KRAS se corresponde con la ausencia de respuesta al tratamiento mediante anticuerpos dirigidos contra el EGFR en pacientes con cáncer colorrectal metastásico y que, en algunos casos, el uso de dicho tratamiento en este subgrupo de pacientes puede resultar perjudicial.<sup>6-7</sup> Las pruebas en las que se basan estos hallazgos provienen de:

- Análisis retrospectivos de estudios con un único grupo<sup>8-9</sup>
- Análisis retrospectivos de estudios aleatorios<sup>10-11</sup>
- Estudios prospectivos aleatorios<sup>12</sup>

Como consecuencia de estos y otros estudios<sup>13-14</sup>, las principales organizaciones oncológicas de los EE. UU. (ASCO, NCCN)<sup>15-16</sup> y de Europa (ESMO)<sup>17</sup> recomiendan las pruebas de mutación en KRAS y NRAS para realizar la selección de los pacientes que deben recibir tratamiento de anticuerpos contra el EGFR. Asimismo, las autoridades regulatorias europeas y estadounidenses han restringido el uso de estos agentes a pacientes con tumores con KRAS no mutado.<sup>18-19</sup>

La prueba **cobas**<sup>®</sup> KRAS Mutation es un ensayo basado en PCR diseñado para identificar la presencia de mutaciones somáticas en los codones 12, 13 y 61 del protooncogén KRAS. Según los datos de la base de datos COSMIC (2015 v72), las mutaciones que detecta la prueba **cobas**<sup>®</sup> KRAS Mutation representan > 97 % de todas las mutaciones en KRAS identificadas en los pacientes con CCR. Por este motivo, se pretende utilizar la prueba como ayuda para la identificación de pacientes con CCR para los que puede estar indicado el tratamiento con Erbitux<sup>®</sup> (cetuximab) o con Vectibix<sup>®</sup> (panitumumab) por el hecho de obtener un resultado de mutación no detectada.

## PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba **cobas**<sup>®</sup> KRAS Mutation (prueba **cobas** KRAS) se basa en dos procesos principales: (1) preparación manual de las muestras para obtener ADN genómico a partir de tejido impregnado en parafina y fijado en formalina (FFPET) y (2) amplificación del ADN diana mediante PCR y un par de cebadores (primers) complementarios y una sonda oligonucleótida con marcador fluorescente. Una sonda está diseñada para detectar la secuencia del codón 12/13 del exón 2 de KRAS y la otra para detectar la secuencia del codón 61 de KRAS en el exón 3 del gen KRAS. Para obtener la detección de la mutación, el analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480 analiza la curva de fusión. Cada serie incluye un control de mutación, un control negativo y un calibrador para confirmar la validez de la serie.

### Preparación de las muestras

El procesamiento de las muestras de FFPET y el aislamiento del ADN genómico se lleva a cabo mediante el **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit, una preparación manual de muestras basada en la unión de ácidos nucleicos a fibras de vidrio. A continuación se realiza la lisis de una sección de 5 µm desparafinada de una muestra de FFPET mediante su incubación a una temperatura elevada con una proteasa y un buffer de lisis/unión caotrópico que liberan ácidos nucleicos y protegen el ADN genómico que liberan las DNAsas. Posteriormente se añade isopropanol a la mezcla de lisis y se centrifuga mediante una columna con un filtro de fibra de vidrio. Durante la fase de centrifugación, el ADN genómico se une a la superficie del filtro de fibra de vidrio. Las sustancias no fijadas, como sales, proteínas y otros desechos celulares, se eliminan mediante centrifugación. Los ácidos nucleicos absorbidos se lavan y, a continuación, se eluyen con una solución acuosa. La cantidad de ADN genómico se determina espectrofotométricamente y se ajusta según una concentración establecida para añadirse a la mezcla de amplificación/detección. A continuación se lleva a cabo la amplificación y detección del ADN de la diana en el analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480 mediante los reactivos de amplificación y detección suministrados con el kit de la prueba **cobas** KRAS.

### Amplificación mediante PCR

#### Selección de la diana

El kit de la prueba **cobas** KRAS utiliza cebadores que definen una secuencia de 85 pares de bases del exón 2 que contiene los codones 12 y 13 de KRAS y una secuencia de 75 pares de bases del exón 3 que contiene el codón 61 de KRAS en ADN genómico humano. La amplificación tiene lugar únicamente en las regiones del gen KRAS situadas entre los cebadores. No se amplifica el gen KRAS entero.

#### Amplificación de la diana

Para la amplificación de la diana se utiliza un derivado de la ADN polimerasa Z05 de la cepa *Thermus*. En primer lugar, se calienta la mezcla de reacción de la PCR para desnaturalizar el ADN genómico y exponer las secuencias de la diana del cebador. A medida que se enfría la mezcla, los cebadores que van en un sentido y en sentido contrario se hibridan con las secuencias del ADN diana. La ADN polimerasa Z05, en presencia de metal divalente y exceso de dNTP, prolonga los cebadores hibridados, lo que conlleva la síntesis con una segunda cadena de ADN. Con esto se completa el primer ciclo de la PCR, que da lugar a una copia de ADN bicatenario que incluye las regiones de la diana de 85 pares de bases y 75 pares de bases del gen KRAS. Este proceso se repite un número determinado de ciclos, en cada uno de los cuales se duplica el volumen de ADN del amplicón.



### Detección de la mutación en tiempo real automatizada


El analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480 puede medir, en tiempo real, el nivel de fluorescencia que generan productos de PCR específicos. Una vez finalizada la amplificación, cada amplicón generado por la prueba **cobas** KRAS se somete a un programa de fusión en el que la temperatura asciende de 40 °C a 95 °C (TaqMelt). La sonda específica para amplicones no mutados se une tanto al amplicón mutado como al no mutado a temperaturas bajas. En el estado de unión, el marcador emisor (reporter) de fluoresceína en el extremo 5' de la sonda se encuentra lo suficientemente alejado del marcador silenciador (quencher) en el extremo 3', lo que permite al marcador fluorescente emitir una longitud de onda luminosa específica. A medida que aumenta la temperatura, la sonda se disocia del amplicón y permite al marcador silenciador posicionarse cerca del marcador fluorescente, lo que disminuye la cantidad de fluorescencia cuantificable. Los amplicones perfectamente unidos a la sonda (no mutados) se funden a una temperatura más alta que los amplicones con uno o más desapareamientos (mutados). La cantidad de fluorescencia se mide en cada incremento de temperatura, momento en el que también se calculan las temperaturas de fusión. Es posible detectar la presencia de una secuencia KRAS mutada en el exón 2 (codones 12 y 13) y en el exón 3 (codón 61) cuando las temperaturas de fusión se encuentran dentro de los intervalos establecidos. Para evitar la detección de mutaciones silenciosas (sin cambios en los aminoácidos) en los codones 12 y 13, una base modificada actúa como base universal y produce una temperatura de fusión dentro del intervalo no mutado.

### Amplificación selectiva

La amplificación selectiva de los ácidos nucleicos de la diana de la muestra se lleva a cabo mediante la prueba **cobas** KRAS gracias a la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y al trifosfato de deoxiuridina (dUTP).<sup>20</sup> La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de cadenas de ADN que contienen deoxiuridina, pero no de cadenas que contienen timidina. El ADN natural carece de desoxiuridina que, sin embargo, está siempre presente en el amplicón debido al uso de dUTP en lugar de trifosfato de timidina como uno de los trifosfatos del nucleótido en el reactivo de la mezcla de reacción, por lo que solo los amplicones contienen desoxiuridina. La desoxiuridina hace que la enzima AmpErase pueda destruir los amplicones contaminantes antes de realizar la amplificación del ADN diana. La enzima AmpErase, que se incluye en el reactivo de la mezcla de reacción, cataliza la escisión del ADN que contiene desoxiuridina en la posición de los residuos de desoxiuridina mediante la apertura de la cadena de la desoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta durante el primer paso del ciclo térmico hasta un nivel pH alcalino, la cadena de ADN del amplicón se rompe en la posición de la desoxiuridina, lo que hace que el ADN ya no puede amplificarse. La enzima AmpErase es inactiva a temperaturas superiores a los 55 °C, es decir, durante los pasos de la ciclación térmica y, por consiguiente, no destruye el amplicón diana.

**REACTIVOS**

<b>cobas® KRAS Mutation Test (KRAS)</b> 24 pruebas (M/N: 05852170190)			
<b>Componentes del kit</b>	<b>Composición del reactivo</b>	<b>Cantidad por kit</b>	<b>Símbolo de seguridad y advertencia<sup>a</sup></b>
<b>KRAS MIX</b> <b>(Mezcla de reacción KRAS)</b>	Buffer Tricina Acetato de potasio Hidróxido potásico Glicerol 4,76 % de sulfóxido de dimetilo < 0,9 % de dNTP < 0,1 % de ADN polimerasa Z05 (microbiana) < 0,1 % de enzima AmpErase (uracilo-N-glicosilasa) (microbiana)	4 × 0,3 ml	 <p><b>ADVERTENCIA</b> H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. P261: Evitar respirar la niebla o los vapores. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.</p> <p>55965-84-9 Masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).</p>
<b>MGAC</b> <b>(Acetato de magnesio)</b>	Acetato de magnesio 0,09 % de azida sódica	4 × 0,2 ml	n.a.
<b>KRAS OM1</b> <b>(Mezcla de oligonucleótidos de KRAS 1)</b>	Buffer Tris-HCl EDTA ARN poli-Ar (sintético) 0,1 % de conservante ProClin® 300 <sup>b</sup> < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente de KRAS < 0,01 % de sonda KRAS con marcador fluorescente	2 × 0,3 ml	 <p><b>ADVERTENCIA</b> H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. P261: Evitar respirar la niebla o los vapores. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.</p> <p>55965-84-9 Masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).</p>

<b>cobas® KRAS Mutation Test (KRAS)</b> 24 pruebas (M/N: 05852170190)			
<b>Componentes del kit</b>	<b>Composición del reactivo</b>	<b>Cantidad por kit</b>	<b>Símbolo de seguridad y advertencia<sup>a</sup></b>
<b>KRAS OM2</b> <b>(Mezcla de oligonucleótidos de KRAS 2)</b>	Buffer Tris-HCl EDTA ARN poli-Ar (sintético) 0,1 % de conservante ProClin® 300 <sup>b</sup> < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente de KRAS < 0,01 % de sonda KRAS con marcador fluorescente	2 × 0,3 ml	 <b>ADVERTENCIA</b> H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. P261: Evitar respirar la niebla o los vapores. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.  55965-84-9 Masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).
<b>KRAS MC</b> <b>(Control de mutación en KRAS)</b>	Buffer Tris-HCl EDTA ARN poli-Ar (sintético) 0,05 % de azida sódica < 0,001 % de ADN plasmídico que contiene secuencias KRAS del exón 2 y 3 (microbianas) < 0,001 % de ADN KRAS no mutado (cultivo celular)	4 × 0,1 ml	n.a.
<b>KRAS CAL</b> <b>(Calibrador KRAS)</b>	Buffer Tris-HCl EDTA ARN poli-Ar (sintético) 0,05 % de azida sódica < 0,001 % de ADN KRAS no mutado (cultivo celular)	4 × 0,1 ml	n.a.
<b>DNA SD</b> <b>(Diluyente para muestras de ADN)</b>	Buffer Tris-HCl 0,09 % de azida sódica	2 × 3,5 ml	n.a.

<sup>a</sup> Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

<sup>b</sup> Sustancia peligrosa.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

### A. **PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.**

- B. Esta prueba debe utilizarse con muestras de tejido de cáncer colorrectal impregnadas en parafina y fijadas en formalina.
- C. No pipetee con la boca.
- D. No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio.
- E. Evite la contaminación microbiana y del ADN de los reactivos.
- F. Deseche los reactivos no utilizados y los residuos según la reglamentación nacional, federal, estatal y local.
- G. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- H. No mezcle reactivos de kits o lotes distintos.
- I. Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.
- J. Es preciso el uso de guantes durante la manipulación de las muestras y los reactivos, así como cambiarse los guantes entre un proceso y otro, para evitar la contaminación.
- K. Para evitar la contaminación del reactivo Master Mix de trabajo (MMX de trabajo) con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área distinta de la de aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Para llevar a cabo una limpieza adecuada, es necesario limpiar todas las superficies, incluidos pipeteadores y bandejas, primero con una solución de hipoclorito\* de sodio al 0,5 % y luego con una solución de etanol al 70 %.

**\* Nota: la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.**

- L. Las muestras deben tratarse como material infeccioso y, como tal, deben aplicarse los procedimientos de seguridad de laboratorio descritos en la publicación *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>21</sup> y en el documento M29-A3 del CLSI.<sup>22</sup>
- M. Los reactivos **MGAC**, **KRAS MC**, **KRAS CAL** y **DNA SD** contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Cuando elimine soluciones que contengan azida sódica vertiéndolas en fregaderos de laboratorio, deje correr abundante agua fría para evitar la formación de depósitos de azida.
- N. Utilice guantes desechables, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule los reactivos. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si no se actúa adecuadamente. Si se producen derrames, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- O. Los elementos desechables son de un solo uso. No deben reutilizarse.
- P. No utilice elementos desechables caducados.
- Q. No utilice soluciones de hipoclorito de sodio (lejía) para limpiar el analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480. Limpie el analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480 según las instrucciones detalladas en el Manual de usuario correspondiente del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 o la Asistencia al usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800.
- R. Si desea conocer las advertencias, precauciones y procedimientos adicionales para reducir el riesgo de contaminación del analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480, consulte el Manual de usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 o la Asistencia al usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800.
- S. Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipetas exentas de DNasa.

## REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

- A. Almacene los reactivos **KRAS MIX**, **MGAC**, **KRAS OM1**, **KRAS OM2**, **KRAS MC**, **KRAS CAL** y **DNA SD** a una temperatura comprendida entre  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez abiertos, estos reactivos permanecen estables para 4 usos durante 60 días o hasta la fecha de caducidad, lo que se produzca primero.
- B. Deje que todos los reactivos se descongelen a una temperatura comprendida entre  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora como mínimo antes de utilizarlos. Una vez descongelados, utilice los reactivos en el plazo de 1 hora y vuelva a almacenar los reactivos que no se hayan utilizado a una temperatura de entre  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el plazo de 1 hora. Una vez abierto, cada vial de reactivos, excepto **DNA SD**, se puede utilizar para pipetear hasta 4 alícuotas durante 60 días o hasta la fecha de caducidad, lo que se produzca primero.
- C. **KRAS OM1**, **KRAS OM2** y la solución MMX de trabajo (preparada mediante la adición de **KRAS OM1** o **KRAS OM2** y **MGAC** a **KRAS MIX**) deben protegerse de la exposición prolongada a la luz.
- D. Una vez preparada, la solución MMX de trabajo debe almacenarse a una temperatura comprendida entre  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad. Las muestras preparadas y los controles deben añadirse como máximo 1 hora después de la preparación de la mezcla MMX de trabajo.
- E. Las muestras procesadas (ADN extraído) se mantienen estables hasta 24 horas a una temperatura de entre  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta 14 días a una temperatura comprendida entre  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  o hasta 60 días a una temperatura comprendida entre  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o después de someterse a 3 ciclos de congelación/descongelación si se almacenan a una temperatura de entre  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El ADN extraído debe amplificarse durante los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit utilizado para extraer el ADN, lo que se produzca primero.
- F. La amplificación se debe iniciar como máximo 1 hora después de la adición de las muestras preparadas y los controles a la mezcla MMX de trabajo (preparada mediante la adición de **KRAS OM1** o **KRAS OM2** y **MGAC** a **KRAS MIX**).

## MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190)
  - Placa AD y película de sellado (Roche M/N: 05232724001) para el sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800
  - Aplicador de película de sellado para el sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 (Roche M/N: 04900383001)
  - Pipeteadores ajustables\* (capacidad para 10 µl, 20 µl, 200 µl y 1000 µl) con filtro para aerosol o puntas exentas de DNasa de desplazamiento positivo
  - Tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo (capacidad de 1,5 ml, estériles, exentos de RNasa/DNasa y grado PCR) (cualquier proveedor)
  - Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN\*\*
  - Agitador vórtex\*\*
  - Bandejas de tubos para microcentrífuga
  - Guantes de laboratorio, sin polvo
- \* *El mantenimiento de los pipeteadores debe realizarse según las instrucciones del fabricante y la precisión de los mismos debe estar dentro del 3 % del volumen indicado. Para evitar la degradación y la contaminación cruzada de la muestra, deben usarse puntas exentas de DNasa con filtro para aerosol o desplazamiento positivo cuando así se especifique.*
- \*\* *Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, según lo establecido en las instrucciones del fabricante.*

## Instrumentos y programa

- Analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480
- Unidad de control del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 SR2 con una imagen del sistema operativo Windows XP
- Software del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 SR2 versión 2.1 o posterior
- Software del paquete de análisis KRAS versión 1.1.0.1330 o superior
- Lector de códigos de barras (Roche M/N: 05339910001)
- Impresora HP P2055d (Roche M/N: 05704375001)

## OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

**NOTA:** *manipule todas las muestras como si pudieran transmitir agentes infecciosos.*

### A. Obtención de las muestras

Las muestras de FFPET de cáncer colorrectal (CRC) se han validado para su uso con la prueba **cobas** KRAS.

### B. Transporte de las muestras

Las muestras de FFPET pueden transportarse a 15-30 °C. El transporte de las muestras de FFPET debe cumplir la reglamentación nacional, federal, estatal local y nacional para el transporte de agentes etiológicos.<sup>23</sup>

### C. Almacenamiento de las muestras

Las muestras de FFPET pueden almacenarse a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C hasta 12 meses tras la fecha de obtención del tejido. Las secciones de 5 µm colocadas en portaobjetos pueden almacenarse a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C hasta 60 días.

## INSTRUCCIONES DE USO

**NOTA:** *con la prueba cobas KRAS solamente deben utilizarse secciones de FFPET con un grosor de 5 µm y con un contenido tumoral por área mínimo del 10 %. Las muestras con un contenido tumoral inferior al 10 % por área deben someterse a macrodissección antes de la extracción de ADN.*

**NOTA:** *consulte el Manual de usuario del sistema cobas® 4800 o la Asistencia al usuario del sistema cobas® 4800 para obtener instrucciones de funcionamiento detalladas del analizador cobas® z 480.*

### Tamaño de la serie

Una única serie puede incluir entre 1 y 45 muestras (además de los controles y el calibrador). Si se analizan más de 24 muestras, será necesario utilizar varios kits de la prueba **cobas** KRAS del mismo lote.

La prueba **cobas** KRAS contiene reactivos suficientes para realizar 8 series de 3 muestras (además de los controles y el calibrador) para un máximo de 24 muestras por kit.

### Flujo de trabajo

#### Aislamiento de ADN

El ADN se aísla de las muestras de FFPET mediante el **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

#### Macrodissección

Si la muestra contiene menos de un 10 % de células tumorales por área, será necesario proceder a su macrodissección como parte de la preparación.

#### Cuantificación del ADN

**NOTA:** *la medición de la concentración de ADN debe realizarse inmediatamente después del procedimiento de aislamiento de ADN y antes del almacenamiento.*

- A. Mezcle cada stock de ADN mediante un agitador vórtex durante 5 segundos.
- B. Cuantifique el ADN mediante un espectrofotómetro, según el protocolo del fabricante. Utilice **DNA EB** del **cobas**® DNA Sample Preparation Kit como blanco para el instrumento. Es necesario un promedio de dos lecturas coincidentes. Si las lecturas de concentración de ADN son  $\geq 20,0$  ng/µl, las dos mediciones no deben presentar una diferencia mayor a  $\pm 10$  % entre ellas. En el caso de las lecturas de concentración de ADN  $< 20,0$  ng/µl, la diferencia entre ambas mediciones no debe superar los  $\pm 2$  ng/µl. Si las dos mediciones presentan una diferencia mayor a  $\pm 10$  % entre ellas cuando las lecturas de concentración de ADN son  $\geq 20,0$  ng/µl o mayor a  $\pm 2$  ng/µl cuando las lecturas de concentración de ADN son  $< 20,0$  ng/µl, se deben realizar 2 lecturas adicionales hasta que se cumplan los requisitos. A continuación, debe calcularse el promedio de estas dos nuevas mediciones.

**NOTA:** *no es necesario medir el stock de ADN del control negativo (NEG CT) procesado.*



- C. La concentración del stock de ADN de las muestras debe ser  $\geq 4$  ng/ $\mu$ l para realizar la prueba **cobas** KRAS. Se realizan dos ciclos de amplificación/detección por muestra, para cada uno de los cuales se utilizan 25  $\mu$ l de una dilución de 2 ng/ $\mu$ l de stock de ADN (un total de 50 ng de ADN).

**NOTA:** cada stock de ADN debe tener una concentración mínima de 4 ng/ $\mu$ l para realizar la prueba **cobas** KRAS. Si la concentración de un stock de ADN es  $< 4$  ng/ $\mu$ l, repita los procedimientos de desparafinación, aislamiento de ADN y cuantificación de ADN para la muestra en cuestión utilizando dos secciones de FFPET de 5  $\mu$ m. En los casos de las muestras colocadas en portaobjetos, tras la desparafinación, combine el tejido de ambas secciones en un tubo, sumerja el tejido en DNA TLB + PK del **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit y lleve a cabo el aislamiento de ADN y la cuantificación. En los casos de las muestras que no están colocadas en portaobjetos, combine las dos secciones en un tubo y lleve a cabo los procesos de desparafinación, aislamiento y cuantificación de ADN. Si la concentración del stock de ADN sigue siendo  $< 4$  ng/ $\mu$ l, solicite otra muestra de FFPET.

**NOTA:** las muestras procesadas (ADN extraído) se mantienen estables hasta 24 horas a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C, hasta 14 días a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C o hasta 60 días a una temperatura comprendida entre -15 °C y -25 °C, o después de someterse a 3 ciclos de congelación/descongelación si se almacenan a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C. El ADN extraído debe amplificarse durante los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit utilizado para extraer el ADN, lo que se produzca primero.

## AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN

**NOTA:** para evitar la contaminación de la mezcla MMX de trabajo con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área distinta de la de aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Para llevar a cabo una limpieza adecuada, es necesario limpiar todas las superficies, incluidos pipeteadores y bandejas, primero con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % y luego con una solución de etanol al 70 %. La lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

### Configuración del instrumento

Consulte el Manual de usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 o la Asistencia al usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 para obtener instrucciones detalladas sobre la configuración del analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480.

### Configuración de las peticiones de pruebas

Consulte el Manual de usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 o la Asistencia al usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 para obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de la prueba **cobas** KRAS.

### Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra

#### Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN entre 4 ng/ $\mu$ l y 28 ng/ $\mu$ l

**NOTA:** es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.

**NOTA:** se realizan 2 ciclos de amplificación/detección para cada muestra que requiere un volumen total de 50  $\mu$ l (25  $\mu$ l cada uno para MMX1 y para MMX2) de una dilución de 2 ng/ $\mu$ l de stock de ADN (un total de 100 ng de ADN).

- A. Para cada muestra, se debe calcular el volumen ( $\mu$ l) de stock de ADN necesario:

$$\mu\text{l de stock de ADN} = (70 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) / \text{concentración de stock de ADN [ng}/\mu\text{l]}$$

- B. Para cada muestra, se debe calcular el volumen ( $\mu$ l) de diluyente para muestras de ADN (**DNA SD**) necesario:

$$\mu\text{l de DNA SD} = 70 \mu\text{l} - \mu\text{l de stock de ADN}$$

Ejemplo:

$$\text{Concentración de stock de ADN} = 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

A.  $\mu\text{l de stock de ADN} = (70 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) / 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 21,5 \mu\text{l}$

B.  $\mu\text{l de DNA SD} = (70 \mu\text{l} - 21,5 \mu\text{l}) = 48,5 \mu\text{l}$

## **Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN > 28 ng/μl**

**NOTA:** *es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.*

**NOTA:** *se realizan 2 ciclos de amplificación/detección para cada muestra que requiere un volumen total de 50 μl (25 μl cada uno para MMX1 y para MMX2) de una dilución de 2 ng/μl de stock de ADN (un total de 100 ng de ADN).*

A. Con concentraciones de stock de ADN > 28 ng/μl, utilice la fórmula siguiente para calcular la cantidad de diluyente para muestras de ADN (**DNA SD**) necesario a fin de preparar al menos 70 μl de stock de ADN diluido. De esta manera se garantiza que cada muestra utilice como mínimo 5 μl de stock de ADN.

B. Para cada muestra, calcule el volumen de (μl) de **DNA SD** necesario para diluir 5 μl de stock de ADN en 2 ng/μl:

$$\text{Vol. de DNA SD necesario en } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l de stock de ADN} \times \text{concentración de stock de ADN en ng}/\mu\text{l}) / 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Ejemplo:

$$\text{Concentración de stock de ADN} = 31,7 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

A. Vol. de **DNA SD** necesario en μl =  $[(5 \mu\text{l} \times 31,7 \text{ ng}/\mu\text{l}) / 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 74,3 \mu\text{l}$

B. Utilice el volumen calculado de **DNA SD** para diluir 5 μl de stock de ADN.

## **Dilución de las muestras**

**NOTA:** *retire el diluyente para muestras (DNA SD) del congelador de almacenamiento de -15 °C a -25 °C y descongélelo de 15 °C a 30 °C durante al menos 1 hora antes de realizar la dilución del ADN. Agite cada reactivo durante 5 segundos y espere a que se deposite el líquido en la parte inferior del tubo antes de utilizarlo.*

A. Prepare el número adecuado de tubos para microcentrífuga de 1,5 ml para diluciones de ADN etiquetándolos con la identificación de muestra correspondiente.

B. Con un pipeteador equipado con una punta resistente a aerosoles, pipetee los volúmenes calculados de **DNA SD** en los tubos etiquetados correspondientes. Pipetee 35 μl de **DNA SD** en un tubo etiquetado como **NEG CT**.

C. Mezcle cada stock de ADN y el control negativo mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.

D. Con un pipeteador con punta de pipeta resistente a aerosoles (una punta nueva para cada pipeteado), pipetee con cuidado el volumen calculado de cada stock de ADN en el tubo etiquetado correspondiente que contiene **DNA SD**. Pipetee 35 μl de control negativo (elución extraída) en el tubo **NEG CT**.

E. Tape los tubos y agítelos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.

F. Cámbiese los guantes.

## **Preparación de las soluciones Master Mix de trabajo (MMX 1 y MMX 2)**

**NOTA:** *KRAS OM1, KRAS OM2 y la mezcla MMX de trabajo son sensibles a la luz y se deben proteger de la exposición a la luz.*

**NOTA:** *debido a la viscosidad de la mezcla KRAS MIX y la mezcla MMX de trabajo, realice el pipeteado lentamente para asegurarse de que dispensa completamente la muestra por la punta.*

**NOTA:** *las mezclas KRAS MIX, KRAS OM1 y KRAS OM2 pueden ser desde transparentes hasta amarillas. Esto no afecta el rendimiento del reactivo.*

Prepare dos mezclas MMX de trabajo a granel, una con **KRAS OM1** y otra con **KRAS OM2** en tubos para microcentrífuga de 1,5 ml individuales.

A. Calcule el volumen de **KRAS MIX** necesario para cada mezcla MMX de trabajo con la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de KRAS MIX necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1 \text{ calibrador} + 1) \times 10 \mu\text{l}$$

B. Calcule el volumen de **KRAS OM1** o **KRAS OM2** necesario para cada mezcla MMX de trabajo con la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de KRAS OM1 o KRAS OM2 necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1 \text{ calibrador} + 1) \times 10 \mu\text{l}$$

C. Calcule el volumen de **MGAC** necesario para cada mezcla MMX de trabajo con la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de MGAC necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1 \text{ calibrador} + 1) \times 6 \mu\text{l}$$

Utilice la Tabla 1 para determinar el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la mezcla MMX de trabajo a partir del número de muestras incluidas en cada serie.

**Tabla 1**  
**Volúmenes de reactivos necesarios para las mezclas de trabajo MMX 1 y MMX 2**

Volúmenes de reactivos necesarios para la solución de trabajo MMX											
N.º de muestras*		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>KRAS MIX</b>	<b>10 µl</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	<b>130</b>	<b>140</b>
<b>KRAS OM1 o OM2</b>	<b>10 µl</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	<b>130</b>	<b>140</b>
<b>MGAC</b>	<b>6 µl</b>	<b>30</b>	<b>36</b>	<b>42</b>	<b>48</b>	<b>54</b>	<b>60</b>	<b>66</b>	<b>72</b>	<b>78</b>	<b>84</b>
<b>Volumen total (µl)</b>		<b>130</b>	<b>156</b>	<b>182</b>	<b>208</b>	<b>234</b>	<b>260</b>	<b>286</b>	<b>312</b>	<b>338</b>	<b>364</b>

\* Incluye volúmenes suficientes para 1 tubo por muestra, 2 tubos de control, 1 tubo de calibrador y 1 tubo adicional.

D. Obtenga los viales necesarios de **KRAS MIX**, **KRAS OM1**, **KRAS OM2** y **MGAC** del congelador de almacenamiento a  $-25^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Deje que todos los reactivos se descongelen a una temperatura comprendida entre  $15^{\circ}\text{C}$  y  $30^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora como mínimo antes de utilizarlos. Agite cada reactivo durante 5 segundos y espere a que se deposite el líquido en la parte inferior del tubo antes de utilizarlo. Etiquete un tubo para microcentrifuga estéril para la solución MMX de trabajo 1 y la solución MMX de trabajo 2.

**NOTA:** las soluciones MMX de trabajo se deben preparar en el plazo de 1 hora tras la descongelación de los reactivos. Una vez descongelados, vuelva a almacenar todos los reactivos sin usar restantes de  $-25^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$  en el plazo de 1 hora tras utilizar el kit.

E. Añada el volumen calculado de **KRAS MIX** a los tubos de MMX de trabajo.

F. Añada el volumen calculado de **KRAS OM1** o **KRAS OM2** al tubo de MMX de trabajo correspondiente.

G. Añada el volumen calculado de **MGAC** a los tubos de MMX de trabajo.

H. Mezcle el contenido de los tubos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 3 a 5 segundos para obtener una mezcla adecuada.

**NOTA:** las muestras, los controles y el calibrador deben añadirse a la placa de amplificación y detección durante la hora siguiente a la preparación de las mezclas de trabajo MMX.

**NOTA:** utilice únicamente la placa de amplificación y detección y la película de sellado (Roche M/N: 05232724001) para el sistema cobas® 4800.

**Ilustración 1**  
**Distribución de la placa de muestras**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	KRAS MC MMX1	KRAS MC MMX2	Muestra 6 MMX1	Muestra 6 MMX2	Muestra 14 MMX1	Muestra 14 MMX2	Muestra 22 MMX1	Muestra 22 MMX2				
<b>B</b>	KRAS NC MMX1	KRAS NC MMX2	Muestra 7 MMX1	Muestra 7 MMX2	Muestra 15 MMX1	Muestra 15 MMX2	Muestra 23 MMX1	Muestra 23 MMX2				
<b>C</b>	KRAS CAL MMX1	KRAS CAL MMX2	Muestra 8 MMX1	Muestra 8 MMX2	Muestra 16 MMX1	Muestra 16 MMX2	Muestra 24 MMX1	Muestra 24 MMX2				
<b>D</b>	Muestra 1 MMX1	Muestra 1 MMX2	Muestra 9 MMX1	Muestra 9 MMX2	Muestra 17 MMX1	Muestra 17 MMX2						
<b>E</b>	Muestra 2 MMX1	Muestra 2 MMX2	Muestra 10 MMX1	Muestra 10 MMX2	Muestra 18 MMX1	Muestra 18 MMX2						
<b>F</b>	Muestra 3 MMX1	Muestra 3 MMX2	Muestra 11 MMX1	Muestra 11 MMX2	Muestra 19 MMX1	Muestra 19 MMX2						
<b>G</b>	Muestra 4 MMX1	Muestra 4 MMX2	Muestra 12 MMX1	Muestra 12 MMX2	Muestra 20 MMX1	Muestra 20 MMX2						
<b>H</b>	Muestra 5 MMX1	Muestra 5 MMX2	Muestra 13 MMX1	Muestra 13 MMX2	Muestra 21 MMX1	Muestra 21 MMX2						

**Configuración de la PCR**

- A. Pipetee 25 µl de mezcla MMX de trabajo en cada pocillo de reacción de la placa de amplificación y detección necesario para la serie. No permita que la punta del pipeteador toque la parte exterior de la placa del pocillo.
  - Añada mezcla MMX1 de trabajo (que contenga **KRAS OM1**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas impares (1, 3, 5, etc.).
  - Añada mezcla MMX2 de trabajo (que contenga **KRAS OM2**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas pares (2, 4, 6, etc.).
- B. Pipetee 25 µl de **KRAS MC** en los pocillos **A1** y **A2** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.
- C. Con una punta de pipeteador nueva, pipetee 25 µl de **NEG CT** en los pocillos **B1** y **B2** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.
- D. Con una punta de pipeteador nueva, pipetee 25 µl de **KRAS CAL** en los pocillos **C1** y **C2** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.

**NOTA:** cada serie debe contener un control positivo (**KRAS MC**) en los pocillos **A1** y **A2**, un control negativo (**NEG CT**) en los pocillos **B1** y **B2**, así como un calibrador (**KRAS CAL**) en los pocillos **C1** y **C2**. En caso contrario, se invalidará la serie.

**NOTA:** cámbiese los guantes según sea necesario para evitar la contaminación entre muestras y en el exterior de los tubos para reacción de la PCR.

- E. Con puntas de pipeteador nuevas para cada ADN de muestra diluida, añada 25 µl del primer ADN de la muestra a los pocillos **D1** y **D2** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces. Repita este procedimiento con el ADN diluido de la segunda muestra (pocillos **E1** y **E2**). Siga la plantilla de la Ilustración 1 hasta que todas las diluciones de ADN de las muestras estén cargadas en la placa de amplificación y detección. Asegúrese de que todo el líquido se deposite en la parte inferior de los pocillos.
- F. Tape la placa de amplificación y detección con la película de sellado (suministrada con las placas). Utilice el sellador para sellar bien la película en la placa de amplificación y detección.
- G. Compruebe que todo el líquido se deposite en la parte inferior de cada pocillo antes de iniciar la PCR.

**NOTA:** los procesos de amplificación y detección deben iniciarse en el plazo de 1 hora después de añadir la primera dilución de ADN de la muestra a la mezcla MMX de trabajo.

## Inicio de la PCR

Consulte la Asistencia al usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 para obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de la prueba **cobas** KRAS.

## Interpretación de los resultados

**NOTA:** la validación de las series y las muestras la lleva a cabo el programa **cobas**<sup>®</sup> 4800.

**NOTA:** una serie de pruebas válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

En las series consideradas válidas, los resultados de las muestras se interpretan tal como se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2**  
**Interpretación de los resultados de la prueba cobas KRAS**

<b>Resultado de la prueba</b>	<b>Resultado de la mutación</b>	<b>Interpretación</b>
Mutation Detected in Codon 12/13	Codón 12/13	Se ha detectado una mutación en KRAS en el codón 12/13.
Mutation Detected in Codon 61	Codón 61	Se ha detectado una mutación en KRAS en el codón 61. No se ha establecido la seguridad y eficacia de Erbitux <sup>®</sup> (cetuximab) o Vectibix <sup>®</sup> (panitumumab) en pacientes que tienen tumores con mutación en el codón 61.
No Mutation Detected*	n.a.	No se ha detectado ninguna mutación de KRAS en el codón 12/13 ni en el 61.
Invalid	n.a.	El resultado de la muestra es no válido. Repita el análisis de las muestras cuyos resultados sean no válidos según las instrucciones que encontrará en el apartado <b>Reanálisis de muestras cuyos resultados son no válidos</b> que figura más adelante.
Failed	n.a.	Serie errónea debido a un problema de hardware o software. Póngase en contacto con su oficina de Roche para recibir asistencia técnica.

\* Un resultado "No Mutation Detected" no excluye la presencia de una mutación en el codón 12/13 y 61 de KRAS porque los resultados dependen del porcentaje de secuencias mutadas, de una correcta integridad de las muestras, de la ausencia de inhibidores y de que haya ADN suficiente para la detección.

## Reanálisis de muestras cuyos resultados son no válidos

- Repita la dilución del stock de ADN de la muestra no válida empezando por los procedimientos **Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra** y **Dilución de las muestras** del apartado **AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN**.
- Después de realizar la dilución del stock de ADN a 2 ng/μl según las instrucciones del apartado **Dilución de las muestras** continúe con los pasos **Preparación de las soluciones Master Mix de trabajo (MMX1 y MMX2)** y con los demás pasos del procedimiento de amplificación y detección.

**NOTA:** si la muestra sigue siendo no válida después de volver a analizarla o si no hay suficiente stock de ADN para preparar otra dilución, consiga una nueva sección de tejido de FFET de 5-μm y vuelva a aislar el ADN con ayuda del **cobas DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)** para repetir el análisis.

## CONTROL DE CALIDAD

En cada serie se incluye un juego de la prueba **cobas**<sup>®</sup> KRAS formado por un control de mutación (**KRAS MC**), un control negativo (**NEG CT**) y un calibrador KRAS (**KRAS CAL**) para las soluciones MMX1 y MMX2 de trabajo. Una serie es válida cuando son válidos los pocillos (**A1** y **A2**) del control de mutación en KRAS (**KRAS MC**), los pocillos (**B1** y **B2**) del control negativo (**NEG CT**) y los pocillos (**C1** y **C2**) del calibrador KRAS (**KRAS CAL**). Si el control de mutación en KRAS (**KRAS MC**), el control negativo (**NEG CT**) o el calibrador KRAS (**KRAS CAL**) para la mezcla MMX1 o MMX2 de trabajo no son válidos, toda la serie se considera no válida y se debe repetir. Prepare una dilución nueva del stock de ADN de la muestra aislada previamente para configurar una nueva placa de amplificación y detección con controles para la amplificación y detección.

## Control positivo

El resultado del control de mutación en KRAS debe ser válido tanto para la solución MMX1 como MMX2 de trabajo. Si los resultados de **KRAS MC** no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

## Control negativo

El resultado del control negativo (**NEG CT**) debe ser válido tanto para la solución MMX1 como MMX2 de trabajo. Si los resultados de **NEG CT** no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

## Calibrador

El resultado del calibrador KRAS (**KRAS CAL**) debe ser válido tanto para la solución MMX1 como MMX2 de trabajo. Si los resultados de **KRAS CAL** no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

## PRECAUCIONES DURANTE EL PROCEDIMIENTO

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial aplicar una técnica adecuada de laboratorio para obtener un rendimiento correcto del ensayo. Debido a la elevada sensibilidad analítica de esta prueba, deben extremarse las precauciones para evitar cualquier tipo de contaminación de los reactivos y las mezclas de amplificación.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. La prueba **cobas** KRAS sólo se ha validado para su uso con muestras de FFPET de cáncer colorrectal.
2. La prueba **cobas** KRAS se ha validado únicamente con el **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190).
3. La detección de una mutación depende del número de copias presentes en la muestra, que puede verse afectado por la integridad de la muestra, la cantidad de ADN aislado y la presencia de sustancias interferentes.
4. La obtención de resultados fiables depende de que la fijación, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento de las muestras sean adecuados. Siga los procedimientos de las Instrucciones de uso del **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190), de estas instrucciones de uso y del Manual de usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800 o la Asistencia al usuario del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800.
5. La incorporación de la enzima AmpErase a la Master Mix de la prueba **cobas** KRAS permite realizar una amplificación selectiva del ADN diana; no obstante, es imprescindible utilizar buenas prácticas de laboratorio y cumplir estrictamente los procedimientos especificados en estas Instrucciones de uso para evitar la contaminación de los reactivos.
6. El uso de este producto debe limitarse al personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y la utilización del sistema **cobas**<sup>®</sup> 4800.
7. Solamente analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480 se ha validado para su uso con este producto. No utilice ningún otro termociclador con detección óptica en tiempo real con este producto.
8. Tampoco se han evaluado los efectos de otras variables potenciales como la fijación de muestras.
9. Aunque es poco probable, las mutaciones en las regiones del ADN genómico del gen KRAS cubiertas por los cebadores y/o las sondas de la prueba **cobas** KRAS pueden causar errores en la detección de la presencia de una mutación. Es posible que las muestras con resultados "No Mutation Detected" contengan mutaciones en KRAS que el ensayo no detecta.
10. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados de falsos negativos o resultados no válidos.
11. Aunque es poco probable (< 0,2 %<sup>24</sup>), la prueba de **cobas** KRAS genera resultados "No Mutation Detected" para algunas mutaciones complejas y múltiples del codón 12/13 y el codón 61, así como una reactividad cruzada limitada para mutaciones situadas en las proximidades del codón 12/13 en el exón 2 y del codón 61 en el exón 3, incluido el codón 59. Cuando una muestra presenta una mutación en las regiones circundantes, la prueba puede generar el resultado "Mutation Detected".
12. Es posible que los pacientes tengan mutaciones adicionales en KRAS (A59X, K117X, A146X) que la prueba no es capaz de detectar. La combinación de estas mutaciones tiene una prevalencia del 0,64 % en CCR.<sup>24</sup> La prueba **cobas** KRAS no detecta las mutaciones en KRAS.

13. La prueba **cobas** KRAS se ha verificado para el uso con 50 ng de ADN por pocillo de reacción. No se recomiendan volúmenes iniciales de ADN inferiores a 50 ng por pocillo de reacción.
14. La prueba **cobas** KRAS es una prueba cualitativa. La prueba no debe utilizarse para realizar mediciones cuantitativas del nivel porcentual de mutación.
15. Debe seguirse el procedimiento descrito anteriormente para detectar  $\geq 5\%$  de secuencias mutadas sobre un fondo de ADN no mutado para las mutaciones de KRAS detectadas por la prueba **cobas** KRAS.<sup>24</sup>
16. Si se pipetea desde el fondo del tubo de elución, el sedimento podría disgregarse y los resultados de la prueba podrían verse afectados. Si se siguen obteniendo resultados no válidos para una muestra después del procedimiento descrito en el apartado **Reanálisis de muestras cuyos resultados son no válidos**, proceda de la manera siguiente: una vez finalizada la elución, centrifugue la muestra eluida durante 1 minuto a  $8000 \times g$  y transfiera una parte del sobrenadante a un tubo nuevo (tubo para microcentrífuga exento de RNasa/DNasa de 1,5 ml) sin alterar el sedimento del fondo del tubo. Deje aproximadamente 20  $\mu$ l de sobrenadante en el fondo del tubo original para evitar la sedimentación, que podría no ser visible. Continúe con el apartado **AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN**.

## EVALUACIÓN NO CLÍNICA DEL RENDIMIENTO

### Sensibilidad analítica — Límite de blanco

Para evaluar el rendimiento de la prueba **cobas** KRAS en ausencia de plantilla y para garantizar que una muestra en blanco no genere una señal analítica que pueda indicar una concentración de mutación baja, se evaluaron muestras de ADN sin plantilla y ADN extraído de muestras KRAS no mutadas de FFPE de CCR. Solo se observaron resultados "No Mutation Detected" en las muestras de plantilla de ADN y en presencia de ADN de KRAS no mutado.

### Sensibilidad analítica con mezclas de muestras de FFPE

Se mezclaron varios extractos de ADN de muestras de FFPE de CCR para mutaciones específicas del codón 12 (G12A, G12C, G12D, G12S, G12V, G12R), una mutación del codón 13 (G13D) y una mutación del codón 61 (Q61Hc) con extractos de muestras de FFPE de KRAS no mutado para conseguir secuencias mutadas con un nivel de mutación aproximado del 10 %, el 5 %, el 2,5 % y el 1,25 %. Se verificaron los niveles finales de mutación de todas las muestras mediante un método de secuenciación paralela masiva (MPS) validado para la detección de las mutaciones específicas del codón 12 (G12A, G12C, G12D, G12S, G12V, G12R), del codón 13 (G13D) y del codón 61 (Q61Hc). Se diluyó cada mezcla de muestras a 2 ng/ $\mu$ l en el momento del análisis (50,0 ng/25  $\mu$ l). Se prepararon diluciones en serie de cada mezcla de muestras y se analizaron ocho (8) réplicas de cada miembro del panel con mutación del codón 12 y el codón 13 utilizando cada uno de los 3 lotes del kit de la prueba **cobas** KRAS (n = 24 por miembro del panel). Se analizaron veinte réplicas de cada miembro del panel con mutación del codón 61 con 3 lotes del kit de la prueba **cobas** KRAS (n = 60 por miembro del panel). La sensibilidad de cada muestra se determinó a partir del volumen más bajo de ADN que generó un resultado "Mutation Detected" para KRAS en como mínimo el 95 % de las réplicas, como se muestra en la Tabla 3. Este estudio demuestra que la prueba **cobas** KRAS permite detectar mutaciones de KRAS en el codón 12, 13 y 61 en secuencias con un nivel de mutación aproximado del 5 % con un volumen estándar de 2 ng/ $\mu$ l.

**Tabla 3**  
**Sensibilidad de la prueba cobas KRAS con mezclas de muestras de FFPE de CCR**

<b>Mutación en KRAS</b>	<b>Codón 12</b>						<b>Codón 13</b>	<b>Codón 61</b>
	<b>G12A</b>	<b>G12C</b>	<b>G12D</b>	<b>G12R</b>	<b>G12S</b>	<b>G12V</b>	<b>G13D</b>	<b>Q61Hc</b>
<b>Nivel de diana</b>	2,5 %	2,5 %	1,25 %	5,0 %	2,5 %	2,5 %	1,25 %	2,5 %
<b>LoD</b>	2,93 %	2,61 %	1,64 %	5,78 %	2,55 %	2,48 %	1,67 %	2,9 %

### Correlación con el método de referencia

Se realizó un estudio para comparar los resultados de la prueba **cobas** KRAS con los de la secuenciación Sanger utilizando 94 muestras de FFPE de CCR. Se procesó una sección de 5  $\mu$ m para aislar ADN de cada muestra tumoral con un lote de **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit y se analizó el ADN extraído con cada uno de los dos lotes de reactivo de la prueba **cobas** KRAS. En las siguientes tablas se resume la información sobre el estadio tumoral, los resultados de la secuenciación bidireccional Sanger y los resultados de la prueba **cobas** KRAS para las 94 muestras.

**Tabla 4**  
**Estadio tumoral vs. secuenciación Sanger**

Estadio tumoral	Resultados de la secuenciación bidireccional doble Sanger				Total	% del total
	Codón 12	Codón 13	Codón 61	No mutado		
Estadio I	1	4	0	3	8	8,5 %
Estadio II	2	8	4	16	30	31,9 %
Estadio III	5	6	3	20	34	36,2 %
Estadio IV	7	5	1	9	22	23,4 %
<b>Total</b>	15	23	8	48	94	100,0 %

\* La secuenciación bidireccional doble Sanger hace referencia a dos lecturas de secuenciación bidireccional Sanger, es decir, un total de 4 lecturas que incluyen 2 lecturas en sentido directo y 2 lecturas en sentido inverso.

**Tabla 5**  
**Comparación de la prueba cobas KRAS con la secuenciación bidireccional Sanger para la detección de mutaciones de KRAS en el codón 12/13 y el codón 61**

		Secuenciación bidireccional doble Sanger			
		Mutación en el codón 12/13	Mutación en el codón 61	NMD	Total
	<b>Mutación en el codón 12/13</b>	37	0	3	40
<b>Prueba cobas KRAS</b>	<b>Mutación en el codón 61</b>	0	8	1	9
	<b>NMD</b>	1	0	44	45
	<b>Total</b>	38	8	48	94

Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) = 97,8 % (IC del 95 % = 88,5-100,0 %)

Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) = 91,7 % (IC del 95 % = 80,0-97,7 %)

Concordancia de porcentaje general (OPA) = 94,7 % (IC del 95 % = 88,0-98,3 %)

NMD: No Mutation Detected

Los resultados discordantes entre la prueba **cobas** KRAS y la secuenciación bidireccional doble Sanger se resolvieron mediante secuenciación 454 y se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6**  
**Comparación de los resultados de la prueba cobas KRAS y la secuenciación bidireccional Sanger resueltos mediante secuenciación 454 para la detección de mutaciones de KRAS en el codón 12/13 y el codón 61**

		Secuenciación bidireccional doble Sanger+454			
		Mutación en el codón 12/13	Mutación en el codón 61	NMD	Total
	<b>Mutación en el codón 12/13</b>	40	0	0	40
<b>Prueba cobas KRAS</b>	<b>Mutación en el codón 61</b>	0	8	1*	9
	<b>NMD</b>	0	0	45	45
	<b>Total</b>	40	8	46	94

Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) = 100,0 % (IC del 95 % = 92,6-100,0 %)

Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) = 97,8 % (IC del 95 % = 88,5-100,0 %)

Concordancia de porcentaje general (OPA) = 98,9 % (IC del 95 % = 94,2-100,0 %)

\* Confirmación de mutación en el codón 59

NMD: No Mutation Detected

En otro estudio se analizaron 188 muestras FFPET de cáncer colorrectal tanto con la prueba **cobas** KRAS como con la secuenciación Sanger utilizando dos lotes de los kits de la prueba **cobas** KRAS almacenados a 2-8 °C. Se obtuvieron resultados comparables con este conjunto de muestras obtenidas, con un PCP del 96,6 % (IC: 90,4-99,3 %), un PCN del 93,0 % (IC: 86,1-97,1 %) y un PCG del 94,7 % (IC: 90,4-97,4 %).



## Reactividad cruzada con otras mutaciones de KRAS en el codón 13

Se ha demostrado que la prueba **cobas** KRAS presenta reactividad cruzada con las siguientes mutaciones que se indican en la Tabla 7. Se mezclaron constructos de plásmido (n = 4) y de FFPET de CCR (n = 1) que contenían mutaciones poco frecuentes del codón 13 con ADN genómico no mutado para crear muestras con un nivel de mutación aproximado del 5 %. Los resultados han demostrado que la prueba **cobas** KRAS presenta reactividad cruzada con las siguientes mutaciones con una tasa de positividad del 100 %. No obstante, no se ha evaluado el rendimiento analítico de la prueba **cobas** KRAS para la detección de dichas mutaciones.

**Tabla 7**  
**Mutaciones que presentan reactividad cruzada con la prueba cobas KRAS**

Mutación	Cambio AA	ID de COSMIC
c.37G>T	<b>G13C</b>	527
c.37G>A	<b>G13S</b>	528
c.37G>C	G13R	529
c.38G>C	<b>G13A</b>	533
c.38G>T	<b>G13V</b>	534

**Negrita = prueba realizada con plásmidos**

### Especificidad: mutación silenciosa de KRAS, homólogos y microorganismos de KRAS

La especificidad de la prueba **cobas** KRAS se evaluó mediante los estudios siguientes:

- Análisis de plásmidos de mutación silenciosa de KRAS
- Análisis de plásmidos de homólogos de KRAS
- Análisis de microorganismos del colon

La evaluación de la reactividad cruzada también se llevó a cabo teniendo en cuenta el hecho de que la presencia o ausencia de plásmidos de mutación silenciosa de KRAS o plásmidos de homólogos de KRAS, o bien de microorganismos del colon, podía interferir en la detección de las mutaciones KRAS en los codones 12, 13 y 61.

#### Plásmidos de mutación silenciosa de KRAS

Se prepararon muestras de plásmidos en un fondo de ADN de línea celular no mutado y se analizaron para detectar las siguientes tres mutaciones silenciosas de KRAS en el codón 12: GGA, GGC y GGG; tres mutaciones silenciosas de KRAS en el codón 13: GGA, GGT y GGG. No se detectó reactividad cruzada con plásmidos para las mutaciones silenciosas de KRAS del codón 12 ni para las mutaciones silenciosas del codón 13.

Se prepararon mezclas plasmídicas del codón 12 ó 13 de KRAS con un 5 % de mutación sobre un fondo de ADN de línea celular no mutado que se analizaron en presencia de los respectivos plásmidos de mutación silenciosa y no se detectó ninguna interferencia de los plásmidos de mutación silenciosa.

#### Plásmidos de homólogos de KRAS

Se prepararon y analizaron por triplicado muestras que contenían cada uno de los seis plásmidos de homólogos de KRAS (pseudogén KRAS del codón 12/13, pseudogén del codón 61, exón 2 de NRAS, exón 3 de NRAS, exón 2 de HRAS y exón 3 de HRAS) sobre un fondo de ADN de línea celular no mutado mediante la prueba **cobas** KRAS. No se detectó reactividad cruzada con ninguna de las muestras de plásmidos.

Se prepararon y analizaron mezclas plasmídicas de los codones 12, 13 y 61 de KRAS con un 5 % de mutación sobre un fondo de ADN de línea celular no mutado en presencia de los respectivos plásmidos de homólogos y no se detectó ninguna interferencia de los plásmidos de homólogos.

#### Microorganismos relacionados con el colon

Se detectó que los siguientes microorganismos relacionados con el colon no presentan reactividad cruzada con la prueba **cobas** KRAS cuando se añaden a 6 muestras de KRAS con mutación en el codón 12, una con mutación en el codón 13, dos con mutación en el codón 61 y una muestra no mutada con una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC durante el proceso de lisis del tejido:

1. *Bacteroides caccae*
2. *Prevotella intermedia*
3. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Los microorganismos analizados tampoco interfirieron en la detección de las mutaciones en el codón 12, el codón 13 y el codón 61 del gen KRAS cuando se añadieron  $1 \times 10^6$  UFC durante el proceso de lisis del tejido de una muestra de KRAS con unos niveles de mutación comprendidos entre el 14 y el 40 %.

## Interferencia

Se ha demostrado que los triglicéridos ( $\leq 37$  mM, la concentración más elevada recomendada por el CLSI<sup>25</sup>) y la hemoglobina ( $\leq 2$  mg/ml, la concentración más elevada recomendada por el CLSI<sup>25</sup>) no interfieren en la detección de la prueba **cobas** KRAS cuando la sustancia interferente potencial se añade al proceso de lisis durante la preparación de la muestra.

## Tejido necrótico

Se ha demostrado que las muestras de FFPET de CCR con un contenido de tejido necrótico de hasta el 50 % para muestras de KRAS mutado y de hasta el 70 % para muestras de KRAS no mutado no interfieren en la identificación de resultados de la prueba **cobas** KRAS.

## Repetibilidad

La repetibilidad de la prueba **cobas** KRAS se determinó con ocho muestras de FFPET de cáncer colorrectal, incluidas 2 muestras de KRAS con mutación en el codón 12, 2 con mutación en el codón 13, 2 con mutación en el codón 61 y 2 no mutadas. Dos operadores analizaron las muestras por duplicado en un centro utilizando dos lotes de reactivos distintos y cuatro analizadores **cobas**<sup>®</sup> z 480 durante 4 días ( $n = 32$ /muestra). La prueba **cobas** KRAS alcanzó una precisión de identificación correcta del 100 % (256/256) para la totalidad de días, muestras, réplicas, operadores y lotes de reactivos combinados.

## Reproducibilidad de la manipulación de las muestras

Se estudió la reproducibilidad del DNA Sample Preparation Kit mediante secciones obtenidas de tres bloques de muestras de FFPET de CCR, uno de los cuales contenía una mutación del codón 12 (G12D, GGT>GAT), otro contenía una mutación del codón 13 (G13D, GGC>GAC) y otro no contenía ninguna mutación del gen KRAS. Se obtuvieron treinta y seis (36) secciones de 5  $\mu$ m de cada una de las tres muestras. Cada uno de los tres centros externos analizó doce (12) secciones de cada muestra durante seis (6) días no consecutivos. Cada día de análisis, un operador de cada laboratorio aislaba, cuantificaba y analizaba el ADN de dos secciones rizadas de tejido FFPET para cada muestra con un lote de **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit y un lote del kit de la prueba **cobas** KRAS. Todos los análisis se realizaron en el analizador **cobas**<sup>®</sup> z 480 con el paquete de análisis KRAS. En este estudio se utilizó un lote de reactivos del kit de la prueba **cobas** KRAS en combinación con tres lotes de **cobas** DNA Sample Preparation Kit en cada laboratorio. Todas las series realizadas en los 3 centros resultaron válidas. Todos los resultados de las muestras mutadas y no mutadas resultaron válidos y generaron el resultado de identificación esperado (identificación correcta = 100 %, 36/36 para cada muestra), lo que demuestra la reproducibilidad de la prueba **cobas** KRAS en el paso preanalítico del aislamiento del ADN.

## EVALUACIÓN CLÍNICA DEL RENDIMIENTO

### Reproducibilidad clínica

Se llevó a cabo un estudio externo para valorar la reproducibilidad de la prueba **cobas** KRAS con un panel de 17 miembros de muestras de ADN extraídas de secciones de FFPET de CCR de muestras tumorales de KRAS sin mutación (WT) y con mutación (MT), muestras que se analizaron por duplicado en 3 laboratorios de análisis con 2 operadores por laboratorio, 3 lotes de reactivo y 5 días de análisis no consecutivos. El panel incluía seis mutaciones del codón 12, una mutación del codón 13 y una mutación del codón 61 junto con una muestra de ADN sin mutación. Se representó cada mutación por duplicado en el límite de detección (LoD) y a  $3 \times$  LoD. En cada serie se utilizaron dos réplicas del panel con las concentraciones deseadas. Se suministraron los paneles a cada uno de los 3 laboratorios de análisis de manera enmascarada. Los operadores realizaron la amplificación y detección con el instrumento **cobas**<sup>®</sup> z 480 y los kits de la prueba **cobas** KRAS. Por serie se entiende un panel analizado por un operador determinado en un laboratorio específico. Cada serie incluía 2 réplicas de cada una de las 17 muestras del panel. Cada operador completó 5 series válidas con cada uno de los 3 lotes de reactivos, que llevaron a cabo en días no consecutivos, y ejecutaron las series de manera independiente respecto al otro usuario del laboratorio. Era preciso finalizar el análisis de un lote antes de seguir con otro lote.

En general, el 97,8 % de las series (90/92) resultaron válidas. Se realizaron un total de 3060 pruebas en 90 series válidas. De las series válidas, el 99,6 % de los resultados de la prueba (3048/3060) fueron válidos. La concordancia en el panel sin mutación fue del 100 % con resultados "No Mutation Detected" para las 175 pruebas válidas. La concordancia para los miembros del panel del codón 12, 13 y 61 a concentraciones  $1 \times$  LoD y  $3 \times$  LoD fue del 100 %. Respecto a todos los componentes variables (p. ej., lote, laboratorio/instrumento, operador, día, intraserie), el coeficiente global de variación osciló entre el 5,1 % y el 13,3 % para todos los miembros del panel.

**Tabla 8**  
**Estimaciones de concordancia generales por miembro del panel**

<b>Miembro del panel</b>	<b>Número de pruebas válidas</b>	<b>Concordancia N</b>	<b>% de concordancia (IC del 95 %)*</b>
No mutado	175	175	100,0 (97,9, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12D — LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12V — LoD	178	178	100,0 (97,9, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12C — LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12A — LoD	179	179	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12S — LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12R — LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12D — 3 × LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12V — 3 × LoD	179	179	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12C — 3 × LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12A — 3 × LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12S — 3 × LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 12 — Mutación 12R — 3 × LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 13 — Mutación 13D — LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 13 — Mutación 13D — 3 × LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 61 — Mutación 61H — LoD	180	180	100,0 (98,0, 100,0)
Codón 61 — Mutación 61H — 3 × LoD	177	177	100,0 (97,9, 100,0)

Nota: se considera que un resultado es concordante cuando una prueba válida de un miembro mutado del panel genera un resultado "Mutation Detected" o cuando una prueba válida de un miembro no mutado del panel genera un resultado "No Mutation Detected".

\* IC del 95 % = intervalo de confianza binominal exacto del 95 %.

### Resultados de la mutación KRAS según diferentes métodos de análisis

Se evaluó el funcionamiento de la prueba **cobas** KRAS en comparación con la secuenciación Sanger y una prueba IVD autorizada por la FDA con relación a la detección de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS en muestras tumorales de CCR de sujetos participantes en el estudio NO16968 de Roche (el estudio Roche). Se analizaron muestras de tejido impregnado en parafina y fijado en formalina (FFPET) de 398 pacientes de este ensayo y 82 muestras de CCR complementarias.

El número total de muestras tumorales para el estudio fue de 480. Diecinueve muestras de la cohorte del estudio de Roche resultaron no aptas para el análisis de mutación en KRAS. De estas, 15 eran no aptas debido al contenido tumoral y 4 porque no se pudieron confirmar como CCR mediante la evaluación patológica. Un total de 461 muestras resultaron aptas y se analizaron con 3 métodos para detectar mutaciones de KRAS.

Se analizaron todas las 461 muestras aptas con la prueba **cobas** KRAS, secuenciación Sanger y una prueba IVD aprobada por la FDA (Tabla 9). En caso de obtener un resultado inicial de la prueba no válido, se repitió el análisis hasta dos veces con la prueba **cobas** KRAS y la otra prueba IVD aprobada por la FDA. En cambio, no existe limitación respecto al número de intentos con la secuenciación Sanger, excepto cuando no queda volumen de muestra restante suficiente para un nuevo análisis. La prueba **cobas** KRAS presentó una tasa de resultados no válidos del 5,4 %. La tasa de resultados no válidos de la secuenciación Sanger fue del 4,6 % y la de la prueba IVD aprobada por la FDA, del 10,8 %, el 8 % de los cuales no superó el paso de valoración de la muestra de ADN y el 2,8 % generó resultados no válidos para el análisis de mutación. Entre las muestras con resultados válidos, la prueba **cobas** KRAS y la prueba IVD aprobada por la FDA generaron tasas similares de positividad para la mutación KRAS en el codón 12/13 (37,4 % vs 36,3 %, respectivamente), mientras que la tasa de positividad para el codón 12/13 con la secuenciación Sanger resultó más baja (29,1 %). La otra prueba IVD aprobada por la FDA no tiene capacidad para detectar mutaciones en el codón 61, pero la prueba **cobas** KRAS Test y la secuenciación Sanger generaron tasas similares de positividad para la mutación de KRAS en el codón 61 (2,1 % vs 2,5 %, respectivamente).

**Tabla 9**  
**Resultado de la mutación en KRAS según diferentes métodos de análisis**

	<b>Prueba cobas KRAS</b>	<b>Prueba IVD aprobada por la FDA</b>	<b>Secuenciación Sanger</b>
Número de muestras analizadas	461	461	461
Resultado no válido	25 (5,4 %)	50 (10,8 %)	21 (4,6 %)
Resultado válido	436 (94,6 %)	411 (89,2 %)	440 (95,4 %)
No Mutation Detected	264 (60,6 %)	262 (63,7 %)	301 (68,4 %)
Mutation Detected	172 (39,4 %)	149 (36,3 %)	139 (31,6 %)
Codón 12/13*	163 (37,4 %)	149 (36,3 %)	128 (29,1 %)
Codón 61	9 (2,1 %)	N.D.**	11 (2,5 %)

Nota: 37 muestras con contenido tumoral  $\geq 20$  % no superaron la valoración de la muestra para la prueba IVD aprobada por la FDA. Estas muestras no se utilizaron para el siguiente paso de detección de la mutación y se contabilizaron como resultados no válidos.

Nota: la validez de los resultados de la prueba se basa en la validez tanto del codón 12/13 como del codón 61 para la prueba **cobas** KRAS y la secuenciación Sanger y solamente en el codón 12/13 para la prueba aprobada por la FDA.

\* El resultado "Mutation Detected" para el codón 12/13 puede incluir muestras con mutaciones tanto en el codón 12/13 como en el codón 61.

\*\* La prueba aprobada por la FDA no tiene capacidad para detectar mutaciones en el codón 61.

**Concordancia de la prueba cobas KRAS con la secuenciación Sanger y la otra prueba IVD aprobada por la FDA con relación a la detección de mutaciones de KRAS en el codón 12/13**

En la Tabla 10 se presenta la concordancia de la prueba **cobas** KRAS con la secuenciación Sanger o la prueba IVD aprobada por la FDA como método de referencia para la detección de mutaciones en el codón 12/13. El PCP entre la prueba **cobas** KRAS y la secuenciación Sanger fue del 96,9 % (IC del 95 %: entre 92,2 % y 98,8 %) y el PCN, del 88,7 % (IC del 95 %: entre 84,7 % y 91,8 %). El PCP entre la prueba **cobas** KRAS y la prueba IVD aprobada por la FDA fue del 93,3 % (IC del 95 %: entre 88,1 % y 96,3 %) y el PCN, del 96,5 % (IC del 95 %: entre 93,5 % y 98,1 %).

**Tabla 10**  
**Comparación de la prueba cobas KRAS con métodos de referencia para la detección de mutaciones de KRAS en el codón 12/13**

<b>Prueba cobas KRAS</b>	<b>Método de referencia</b>							
	<b>Secuenciación Sanger</b>				<b>Prueba IVD aprobada por la FDA</b>			
	<b>Mutación detectada en el codón 12/13</b>	<b>Mutación no detectada en el codón 12/13</b>	<b>No válido</b>	<b>Total</b>	<b>Mutación detectada en el codón 12/13</b>	<b>Mutación no detectada en el codón 12/13</b>	<b>No válido</b>	<b>Total</b>
<b>Mutación detectada en el codón 12/13</b>	124	34	5	163	139	9	15	163
<b>Mutación no detectada en el codón 12/13</b>	4	268	2	274	10	248	16	274
<b>No válido</b>	0	19	5	24	0	5	19	24
<b>Total</b>	128	321	12	461	149	262	50	461
<b>PCP (IC del 95 %)</b>	96,9 % (92,2 %, 98,8 %)				93,3 % (88,1 %, 96,3 %)			
<b>PCN (IC del 95 %)</b>	88,7 % (84,7 %, 91,8 %)				96,5 % (93,5 %, 98,1 %)			
<b>OPA (IC del 95 %)</b>	91,2 % (88,1 %, 93,5 %)				95,3 % (92,8 %, 97,0 %)			

Nota: validez de los resultados de la prueba basada en la validez del codón 12/13 SOLO para los 3 métodos.

\* El resultado "Mutation Detected" para el codón 12/13 puede incluir muestras con mutaciones tanto en el codón 12/13 como en el codón 61.

\*\* El resultado "No Mutation Detected" para el codón 12/13 puede incluir muestras con mutaciones solo en el codón 61.

## Valores predictivos de la prueba cobas KRAS para la detección de mutaciones de KRAS en el codón 12/13

El cálculo de los valores predictivos de la prueba **cobas** KRAS para la detección del codón 12/13 se realizó mediante la combinación del PCP y el PCN de la prueba **cobas** KRAS relativos a un método de comparación junto con la prevalencia de un resultado “Mutation Detected for codon 12/13” de KRAS por el método de comparación de estudios clínicos publicados para cetuximab o panitumumab.<sup>26-29</sup> Los valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN) de la prueba **cobas** KRAS hace referencia a los valores predictivos de los resultados “Mutation Detected for codon 12/13” y “No Mutation Detected for codon 12/13” del método de comparación, respectivamente.<sup>30</sup> El rendimiento clínico se ha resumido por la cantidad de VPP+VPN-1; esta cantidad se denomina factor de atenuación.<sup>30</sup>

**Tabla 11**  
**Factores de atenuación para la prueba cobas KRAS (codón 12/13)**

Fuente de datos <sup>Ref</sup>	Método de comparación	VPP (IC del 95 %)	VPN (IC del 95 %)	Factor de atenuación (IC del 95 %)
<b>Cetuximab<sup>26</sup></b>	Secuenciación Sanger	0,858 (0,811, 0,902)	0,975 (0,946, 0,994)	83,3 % (77,7, 88,3)
<b>Cetuximab<sup>31</sup></b>	Prueba IVD aprobada por la FDA	0,957 (0,927, 0,981)	0,945 (0,909, 0,978)	90,2 % (85,6, 94,4)
<b>Panitumumab<sup>29, 32</sup></b>	Prueba IVD aprobada por la FDA	0,949 (0,914, 0,977)	0,956 (0,927, 0,981)	90,4 % (86,1, 94,4)

## Concordancia entre la prueba cobas KRAS y la secuenciación Sanger para el codón 61

La concordancia de la prueba **cobas** KRAS y la secuenciación Sanger para la detección de mutaciones en el codón 61 se presenta en la Tabla 12. Con los resultados válidos únicamente, se estima un PCP del 100 % (IC del 95 %: 70,1 %, 100 %) y un PCN del 99,3 % (IC del 95 %: 97,9 %, 99,8 %).

**Tabla 12**  
**Concordancia entre la prueba cobas KRAS y la secuenciación Sanger (codón 61)**

		Secuenciación Sanger			Total
		Mutación detectada en el codón 61	Mutación no detectada en el codón 61	No válido	
<b>Prueba cobas KRAS</b>	<b>Mutación detectada en el codón 61</b>	9	3	0	12
	<b>Mutación no detectada en el codón 61</b>	0	420	4	424
	<b>No válido</b>	2	13	10	25
	<b>Total</b>	11	436	14	461
<b>Solo con resultado válido</b>	<b>PCP (IC del 95 %)</b>	100,0 % (70,1 %, 100,0 %)			
	<b>PCN (IC del 95 %)</b>	99,3 % (97,9 %, 99,8 %)			

Nota: la validez de los resultados de la prueba se basa en la validez tanto del codón 12/13 como del codón 61.

## LISTA DE AVISOS DE RESULTADOS


Los avisos de resultados se muestran en la pestaña de **resultados**. El origen de un aviso se indica en el código del mismo, tal como se describe en la Tabla 13.

La Tabla 14 incluye todos los avisos de resultados del sistema relevantes para el usuario.

**Tabla 13 Origen del aviso**

Inicio del código del aviso	Origen del aviso	Ejemplo
M	Múltiples motivos u otros motivos	M6
R	Interpretación de los resultados	R20
Z	Analizador	Z1

**Tabla 14 Lista de avisos del sistema**

Código del aviso	Importancia	Descripción	Acción recomendada
M1	Error	Error: se ha producido un error en el software. Para obtener más información, consulte los mensajes de alarma y los archivos de registro.	Consulte los mensajes de alarma y los archivos de registro. Si no funciona, póngase en contacto con el servicio técnico de Roche.
M2	Información	Información: serie anulada por el usuario.	Ninguna. El aviso es informativo.
M6	Información	Información: se ha perdido la comunicación con el analizador <b>cobas</b> <sup>®</sup> z 480. Se ha recuperado la serie después de restablecer la comunicación.	Ninguna. El aviso es informativo.  Para obtener más información, consulte la recuperación de series en el Manual del equipo del analizador <b>cobas</b> <sup>®</sup> z 480.
R251–R252 R261–R262	Error	El control de mutación está fuera de rango.	<p>Repita la serie. Consulte el apartado <i>Control de calidad</i> de las Instrucciones de uso específicas de la prueba.</p> <p>Estos códigos de aviso indican que una o más de las temperaturas de fusión del control de mutación están fuera del rango establecido. Esto podría suceder en caso de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo.</li> <li>Error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo a uno o a los dos pocillos para el control de mutación de la microplaca (posiciones A01 para R251-252 y A02 para R261-262).</li> <li>Error de pipeteo al añadir el control de mutación a uno o a los dos pocillos para el control de mutación de la microplaca (posiciones A01 para R251-252 y A02 para R261-262).</li> <li>No se ha añadido el control de mutación a uno o a los dos pocillos para el control de mutación de la microplaca (posiciones A01 para R251-252 y A02 para R261-262).</li> <li>Contaminación del ADN.</li> </ul>

Código del aviso	Importancia	Descripción	Acción recomendada
R253–R255 R263–R265	Error	El control de mutación está fuera de rango.	<p>Repita la serie. Consulte el apartado <i>Control de calidad</i> de las Instrucciones de uso específicas de la prueba.</p> <p>Estos códigos de aviso indican que los valores de altura de pico observados para la fusión y otros parámetros del control de mutación están fuera del rango establecido. Esto podría suceder en caso de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo.</li> <li>• Error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo a uno o a los dos pocillos para el control de mutación de la microplaca (posiciones A01 para R253–255 y A02 para R263–265).</li> <li>• Error de pipeteo al añadir el control de mutación a uno o a los dos pocillos para el control de mutación de la microplaca (posiciones A01 para R253–255 y A02 para R263–265).</li> <li>• No se ha añadido el control de mutación a uno o a los dos pocillos para el control de mutación de la microplaca (posiciones A01 para R253–255 y A02 para R263–265).</li> </ul>
R256–R257 R266–R267	Error	El control negativo está fuera de rango.	<p>Repita la serie. Consulte el apartado <i>Control de calidad</i> de las Instrucciones de uso específicas de la prueba.</p> <p>Estos códigos de aviso indican que uno o más de los valores de altura de pico están por encima del umbral establecido para el control negativo. Este podría suceder en caso de contaminación del ADN.</p>
R258, R268	Error	Calibrador fuera del intervalo.	<p>Repita la serie. Consulte el apartado <i>Control de calidad</i> de las Instrucciones de uso específicas de la prueba.</p> <p>Estos códigos de aviso indican que la temperatura de fusión del calibrador está fuera del rango establecido. Esto podría suceder en caso de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo.</li> <li>• Error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo a uno o a los dos pocillos para el calibrador de la microplaca (posiciones C01 para R258 y C02 para R268).</li> <li>• Error de pipeteo al añadir el calibrador a uno o a los dos pocillos para el calibrador de la microplaca (posiciones C01 para R258 y C02 para R268).</li> <li>• No se ha añadido el calibrador a uno o a los dos pocillos para el calibrador de la microplaca (posiciones C01 para R258 y C02 para R268).</li> <li>• Contaminación del ADN.</li> </ul>

Código del aviso	Importancia	Descripción	Acción recomendada
R259, R269	Error	Calibrador fuera del intervalo.	<p>Repita la serie. Consulte el apartado <i>Control de calidad</i> de las Instrucciones de uso específicas de la prueba.</p> <p>Estos códigos de aviso indican que los valores de altura de pico no mutados observados para el calibrador están por debajo del umbral establecido. Esto podría suceder en caso de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo.</li> <li>• Error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo a uno o a los dos pocillos para el calibrador de la microplaca (posiciones C01 para R259 y C02 para R269).</li> <li>• Error de pipeteo al añadir el calibrador a uno o a los dos pocillos para el calibrador de la microplaca (posiciones C01 para R259 y C02 para R269).</li> <li>• No se ha añadido el calibrador a uno o a los dos pocillos para el calibrador de la microplaca (posiciones C01 para R259 y C02 para R269).</li> </ul>
R260, R270	Error	Calibrador fuera del intervalo.	<p>Repita la serie. Consulte el apartado <i>Control de calidad</i> de las Instrucciones de uso específicas de la prueba.</p> <p>Estos códigos de aviso indican que el valor de altura de pico observado para el pico de mutación está por encima del límite preestablecido. Este podría suceder en caso de contaminación del ADN.</p>
R271–R278	Error	Control de mutación no detectado.	<p>Repita la serie. Consulte el apartado <i>Control de calidad</i> de las Instrucciones de uso específicas de la prueba.</p> <p>Estos códigos de aviso indican que las temperaturas de fusión para el control de mutación no son válidas o son negativas (para el pico de mutación y/o no mutado). Esto podría suceder en caso de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo.</li> <li>• Error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo a uno o a los dos pocillos para el control de mutación de la microplaca (posiciones A01 para R271-274 y A02 para R275-278).</li> <li>• Error de pipeteo al añadir el control de mutación a uno o a los dos pocillos para el control de mutación de la microplaca (posiciones A01 para R271-274 y A02 para R275-278).</li> <li>• No se ha añadido el control de mutación a uno o a los dos pocillos para el control de mutación de la microplaca (posiciones A01 para R271-274 y A02 para R275-278).</li> </ul>



Código del aviso	Importancia	Descripción	Acción recomendada
R279–R282 R299–R302	Error	No se han detectado resultados.	<p>Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado <i>Interpretación de los resultados</i> de las Instrucciones de uso específicas de la prueba.</p> <p>Estos códigos de aviso indican que no se ha podido detectar la temperatura de fusión tanto mutada como no mutada. Esto podría suceder en caso de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo.</li> <li>• Error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo a uno o más pocillos de reacción de la microplaca.</li> <li>• Error de pipeteo al añadir la plantilla de ADN a uno o más pocillos de reacción de la microplaca.</li> <li>• ADN amplificable disponible insuficiente.</li> </ul>
R283–R297 R303–R317	Error	El resultado está fuera de rango.	<p>Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado <i>Interpretación de los resultados</i> de las Instrucciones de uso específicas de la prueba.</p> <p>Estos códigos de aviso indican que las temperaturas de fusión mutadas o no mutadas y/o los valores de altura de pico están fuera del rango establecido. Esto podría suceder en caso de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo.</li> <li>• Error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo a uno o más pocillos de reacción de la microplaca.</li> <li>• Error de pipeteo al añadir la plantilla de ADN a uno o más pocillos de reacción de la microplaca.</li> <li>• ADN amplificable disponible insuficiente.</li> </ul>
Z1	Error	Error: error en el <b>cobas</b> z 480. Se ha cancelado la serie.	Póngase en contacto con el servicio técnico de Roche.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Shankaran V, Obel J, Benson III AB. Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer: current practice and future directions. *The Oncologist* 2010 15:157-67.
2. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, et al. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Nov 9(11):1193-7.
3. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001 Sep 1;85(5):692-6.
4. De Roock W, Claes B, Bernasconi D. et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncology*, 2010 Aug 11(8):753-62.
5. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009 Oct 7;101(19):1308-24.
6. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 Feb 10;27(5):663-71.
7. Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009 Feb 5;360(6):563-72.
8. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006 Apr 15;66(8):3992-5.
9. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007 Mar 15;67(6):2643-8.
10. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
11. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
12. Douillard J-Y, Siena S, Cassidy J et al. randomized, Phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovin, and Oxaliplatin (FOXFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol* 2010 28:4697-4705.
13. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer* (2009) 101, 715 – 721.
14. Morris VK, San Lucas FA, Overman MJ et al. Clinicopathologic characteristics and gene expression analyses of non-KRAS 12/13, RAS-mutated metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology* 25: 2008-2014, 2014 doi:10.1093/annonc/mdu252.
15. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009 Apr 20;27(12):2091-6.
16. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Colon cancer, 2014, v.3.
17. Van Cutsem E, Oliveira J; ESMO Guidelines Working Group. Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009 May;20 Suppl 4:61-3.
18. Food and Drug Administration. Class labeling changes to anti-EGFR monoclonal antibodies, cetuximab (Erbix) and panitumumab (Vectibix): KRAS mutations. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm1172905.htm>.
19. European Medicines Agency: Committee for Medicinal Products for Human Use post-authorisation summary of positive opinion for Erbitux. [http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/Erbitux\\_28040208en.pdf](http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/Erbitux_28040208en.pdf).
20. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 93:125-128.
21. Chosewood, L.C. and Wilson, D.E. Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Fifth # edition. (CDC) 21-1112. 2009.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Villanova, PA:CLSI, 2005.
23. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 60th Edition. 2019.
24. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), 2015, v.72, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guidelines – Second Edition, Appendix D 2005.

26. Karapetis CS, et al. Kras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008 Oct 23; 359(17):1757-65.
27. Van Cutsem E, et al. Open label Phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25: 1658 -1664, 2007.
28. Amado RG, et al: Wild type KRAS is required for Panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 1626-1634, 2008.
29. Douillard J, et al. Randomized, phase II trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol* 28: 4697-4705, 2010.
30. Pennello GA. Analytical and clinical evaluation of biomarkers assays: when are biomarkers ready for prime time? *Clin Trials* 10(5): 666-76, 2013.
31. Summary Of Safety And Effectiveness Data for PMA P110030 [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf11/P110030b.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf11/P110030b.pdf)
32. Summary Of Safety And Effectiveness Data for PMA P110027 [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf11/P110027b.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf11/P110027b.pdf)

## Información de revisión del documento

Doc Rev. 6.0  
05/2024

Se ha actualizado la información sobre peligros.  
Se ha actualizado la página de símbolos armonizados.  
Se ha incluido el apartado **Asistencia técnica**.  
Se ha actualizado el apartado **Marcas registradas y patentes**, incluido el enlace.  
Se ha incluido el símbolo IVD.  
Se ha actualizado la marca **cobas**<sup>®</sup>.  
Se ha incluido el texto “Rx only” encima del fabricante legal.  
Se ha actualizado para reflejar los Operadores Económicos actuales.  
Se ha eliminado el símbolo “Distributed by”.  
Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.

## Asistencia técnica

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con su filial local:  
[https://www.roche.com/about/business/roche\\_worldwide.htm](https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm)

## Fabricante y distribuidor

Rx only



Fabricado en los Estados Unidos

Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany  
[www.roche.com](http://www.roche.com)

Fabricado en los EE. UU.

Distributed by Roche Diagnostics  
9115 Hague Road  
Indianapolis, IN 46250-0457, USA  
(For Technical Assistance call the  
Roche Response Center  
toll-free: 1-800-526-1247)

## Marcas registradas y patentes



























Consulte <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

## Derechos de autor

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Los símbolos siguientes se emplean en el rotulado de todos los productos de diagnóstico por PCR de Roche.

<b>Age/DOB</b> Edad o fecha de nacimiento	 Dispositivo no apto para análisis en el lugar de asistencia al paciente	<b>QS IU/PCR</b> UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.
 Software auxiliar	 Dispositivo no apto para autodiagnóstico	<b>SN</b> Número de serie
<b>Assigned Range [copies/mL]</b> Intervalo asignado (copias/ml)	 Distribuidor <i>(Nota: el país o la región se indicará debajo de este símbolo.)</i>	<b>Site</b> Centro
<b>Assigned Range [IU/mL]</b> Intervalo asignado (UI/ml)	 No deben reutilizarse	<b>Procedure Standard</b> Procedimiento estándar
<b>EC REP</b> Representante autorizado en la Comunidad Europea	 Mujeres	<b>STERILE EO</b> Esterilizado con óxido de etileno
<b>BARCODE</b> Hoja de datos del código de barras	 Para evaluación del rendimiento IVD únicamente	 Almacenar en la oscuridad
<b>LOT</b> Código de lote	<b>GTIN</b> Número mundial de artículo comercial	 Límite de temperatura
 Riesgo biológico	 Importador	 Archivo de definición de la prueba
<b>REF</b> Número de catálogo	<b>IVD</b> Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Este lado hacia arriba
 Marcado CE de conformidad; este dispositivo cumple con los requisitos aplicables para el marcado CE de un dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> .	<b>LLR</b> Límite inferior del intervalo asignado	<b>Procedure UltraSensitive</b> Procedimiento ultrasensible
<b>Collect Date</b> Fecha de recogida	 Hombres	<b>UDI</b> Identificador único del producto
 Consulte las instrucciones de uso	 Fabricante	<b>ULR</b> Límite superior del intervalo asignado
 Suficiente para <n> pruebas	<b>CONTROL -</b> Control negativo	<b>Urine Fill Line</b> Línea de llenado de orina
<b>CONTENT</b> Contenido del kit	 Sin esterilizar	<b>Rx Only</b> Para los EE. UU.: Precaución: la ley federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.
<b>CONTROL</b> Control	 Nombre del paciente	 Fecha de caducidad
 Fecha de fabricación	 Número del paciente	
 Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente	 Abrir aquí	
 Dispositivo para autodiagnóstico	<b>CONTROL +</b> Control positivo	
	<b>QS copies / PCR</b> Copias QS por reacción de PCR, utilice copias QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.	