



Rx Only

cobas[®] PIK3CA Mutation Test

Para diagnóstico in vitro



cobas[®] PIK3CA Mutation Test

24 Tests

P/N: 07003986190

Para las muestras FFPET, consulte el **cobas[®] DNA Sample Preparation Kit** (M/N 05985536190) para la preparación de las muestras.

TABLA DE CONTENIDO

Uso previsto

Resumen y explicación de la prueba

Información de referencia.....	4
Principios del procedimiento	5
Secuencias de referencia.....	5
Preparación de las muestras.....	6
Amplificación mediante PCR.....	6
Selección de la diana	6
Amplificación de la diana.....	6
Detección de la mutación en tiempo real automatizada.....	6
Amplificación selectiva.....	7

Reactivos y materiales

Reactivos suministrados para la prueba cobas® PIK3CA Mutation Test, 24 pruebas (P/N: 07003986190).....	7
Requisitos de almacenamiento y manipulación.....	8
Material adicional necesario	8
Equipos y programas necesarios pero no suministrados.....	8

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones.....	9
Buenas prácticas de laboratorio.....	9
Contaminación	9
Integridad	10
Eliminación de residuos	10
Limpieza de derrames.....	10
Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras.....	10
Recogida de muestras	10
Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras	10
Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas	11

Procedimiento analítico

Realización de la prueba.....	11
Instrucciones de uso.....	12
Controles para todo el proceso.....	12
Amplificación y detección.....	13
Configuración de las reacciones.....	15
Preparación de la placa.....	16
Inicio de la PCR.....	17

Resultados

Interpretación de los resultados	18
Repetición del análisis de las muestras con resultados no son válidos	19
Control de calidad y validez de los resultados.....	19
Control de mutación.....	19
Control negativo.....	19
Limitaciones del procedimiento.....	19

Evaluación no clínica del rendimiento

Características clave de rendimiento	21
Sensibilidad analítica — Límite de blanco (LdB).....	21
Límite de detección con mezclas de muestras FFPET	21
Detección de genotipos poco frecuentes mediante plásmidos	23
Repetibilidad	23
Correlación con el método de referencia	23
Reactividad cruzada	27
Evaluación de posibles sustancias interferentes.....	27

Evaluación clínica del rendimiento

Estudio de reproducibilidad clínica	28
-------------------------------------------	----

Avisos de resultados

Explicación de los avisos de resultados	29
-----------------------------------------------	----

Información adicional

Características principales del ensayo	31
Símbolos	32
Asistencia técnica	34
Fabricante y distribuidores	34
Marcas registradas y patentes	34
Copyright.....	34
Bibliografía	35
Revisión del documento.....	36

Uso previsto

El ensayo cobas® PIK3CA Mutation Test es una prueba de PCR a tiempo real para la detección e identificación cualitativas de 17 mutaciones en los exones 2, 5, 8, 10 y 21 del gen codificador de la subunidad catalítica de la fosfoinositida-3-quinasa (PIK3CA) en ADN aislado de tejido tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina (FFPET). El ensayo cobas® PIK3CA Mutation Test es una prueba de PCR a tiempo real para su uso en el cobas® 4800 System diseñada para identificar pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores presentan estas mutaciones.

Resumen y explicación de la prueba

Información de referencia

La vía de señalización de la fosfoinositida-3-quinasa (PI3K) es un regulador clave de numerosas características del comportamiento celular normal, incluido el crecimiento, la supervivencia, la motilidad y la proliferación celular.¹⁻³ La activación y desregularización de la vía de la PI3K se han relacionado en una amplia variedad de cánceres humanos.⁴ En el cáncer, un mecanismo importante de la activación de la vía se produce mediante receptores conocidos como receptores de tirosina quinasa (RTK), tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2) o el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). PI3K, Akt y mTOR presentan 3 uniones importantes en la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR.⁵ La activación de la vía de la PI3K causa la conversión del fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP3), un importante mensajero secundario que estimula una amplia gama de vías de efectores descendentes, incluidos Akt y mTOR. La activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR da lugar a numerosos procesos celulares, incluido el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular.⁶

El PIK3CA es uno de los oncogenes más frecuentemente mutado que se ha identificado en los cánceres humanos. Asimismo, la mayoría de las mutaciones registradas tienen lugar en unos pocos “puntos calientes” de la proteína (codones 1047 [40 %], 545 [25 %] y 542 [13 %]).⁷ La mayor parte de las mutaciones se producen principalmente en los exones 10 y 21 del PIK3CA. Sin embargo, también se han identificado mutaciones activadoras en los exones 2, 5 y 8. En la base de datos COSMIC se demuestra que el PIK3CA presenta una mutación del 12 % en todos los tipos de tumores. En el caso del cáncer de mama, se han detectado mutaciones en PIK3CA en el 26 % de los tumores analizados. Se ha demostrado que las mutaciones en PIK3CA son más comunes en cánceres de mama con receptores de hormonas positivos (~40 %) y HER-2 positivos (~25 %).^{8,9}

Entre las mujeres, el cáncer de mama es el tumor maligno diagnosticado con mayor frecuencia y la causa principal de muerte por cáncer. En 2017, el cáncer de mamá supuso el 25 % de los casos totales de cáncer y el 15 % de las muertes por cáncer en mujeres en todo el mundo.¹⁰ Se estima que aproximadamente la mitad de los casos de cáncer de mama y el 60 % de las muertes se producen en países desarrollados económicamente. En términos generales, las tasas de incidencia son elevadas en Europa Occidental y Septentrional, Australia/Nueva Zelanda y América del Norte. Los elementos que contribuyen a la variación internacional de las tasas de incidencia tienen su origen en gran medida en las diferencias de los factores reproductivos y hormonales y de la disponibilidad de servicios de detección precoz.¹¹ Se necesitan nuevas terapias para combatir la alta incidencia del cáncer de mama en general y el elevado número de muertes causadas por el cáncer de mama. Conocer el estado mutacional del gen PIK3CA es fundamental para utilizar terapias dirigidas a la actividad de la vía del PIK3CA.

Las mutaciones detectadas por la prueba cobas® PIK3CA Mutation Test (prueba cobas PIK3CA) se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1: Mutaciones detectadas por la prueba cobas® PIK3CA

Número de exón de PIK3CA actual	Número de exón de PIK3CA anterior*	Mutación en PIK3CA	Secuencia de ácidos nucleicos de PIK3CA	Nomenclatura de proteínas según HGVS**	Nomenclatura de nucleótidos según HGVS**	ID de COSMIC ¹²
2	1	R88Q	263G>A	NM_006218.2:p.(Arg88Gln)	NM_006218.2:c.263G>A	746
5	4	N345K	1035T>A	NM_006218.2:p.(Asn345Lys)	NM_006218.2:c.1035T>A	754
8	7	C420R	1258T>C	NM_006218.2:p.(Cys420Arg)	NM_006218.2:c.1258T>C	757
10	9	E542K	1624G>A	NM_006218.2:p.(Glu542Lys)	NM_006218.2:c.1624G>A	760
10	9	E545A	1634A>C	NM_006218.2:p.(Glu545Ala)	NM_006218.2:c.1634A>C	12458
10	9	E545D	1635G>T	NM_006218.2:p.(Glu545Asp)	NM_006218.2:c.1635G>T	765
10	9	E545G	1634A>G	NM_006218.2:p.(Glu545Gly)	NM_006218.2:c.1634A>G	764
10	9	E545K	1633G>A	NM_006218.2:p.(Glu545Lys)	NM_006218.2:c.1633G>A	763
10	9	Q546E	1636C>G	NM_006218.2:p.(Gln546Glu)	NM_006218.2:c.1636C>G	6147
10	9	Q546K	1636C>A	NM_006218.2:p.(Gln546Lys)	NM_006218.2:c.1636C>A	766
10	9	Q546L	1637A>T	NM_006218.2:p.(Glu546Leu)	NM_006218.2:c.1637A>T	25041
10	9	Q546R	1637A>G	NM_006218.2:p.(Gln546Arg)	NM_006218.2:c.1637A>G	12459
21	20	H1047L	3140A>T	NM_006218.2:p.(His1047Leu)	NM_006218.2:c.3140A>T	776
21	20	H1047R	3140A>G	NM_006218.2:p.(His1047Glu)	NM_006218.2:c.3140A>G	775
21	20	H1047Y	3139C>T	NM_006218.2:p.(His1047Tyr)	NM_006218.2:c.3139C>T	774
21	20	G1049R	3145G>C	NM_006218.2:p.(Gly1049Glu)	NM_006218.2:c.3145G>C	12597
21	20	M1043I	3129G>T	NM_006218.2:p.(Met1043Ile)	NM_006218.2:c.3129G>A	773

* Numeración del exón de PIK3CA anterior excluido el primer exón no traducido.

** HGVS - Human Genome Variation Society

Principios del procedimiento

La prueba **cobas** PIK3CA se basa en dos procesos principales: (1) preparación manual de las muestras para obtener ADN genómico a partir de FFPET y (2) amplificación y detección del ADN diana mediante PCR y pares de cebadores (primers) complementarios y sondas oligonucleótidas con marcadores fluorescentes. La prueba está diseñada para detectar R88Q en el exón 2, N345K en el exón 5, C420R en el exón 8, E542K, E545X (E545A, E545D*, E545G y E545K), Q546X (Q546E, Q546K, Q546L y Q546R) en el exón 10 y M1043I**, H1047X (H1047L, H1047R, y H1047Y) y G1049R en el exón 21. La detección de la mutación se realiza mediante el análisis de PCR con el **cobas z 480 analyzer**. Cada serie incluye un control de mutación y un control negativo para confirmar la validez de la serie.

* Para el cambio de aminoácido E545D, la prueba solo detecta la mutación c.1635G>T del cambio de nucleótido.

** Para el cambio de aminoácido M1043I, la prueba solo detecta la mutación c.3129G>T del cambio de nucleótido.

Secuencias de referencia

Consulte la fuente siguiente para conocer la secuencia de referencia para el gen PIK3CA.¹³

PIK3CA: LRG_310t1

Preparación de las muestras

El procesamiento de las muestras FFPET y el aislamiento del ADN se lleva a cabo mediante el **cobas**® DNA Sample Preparation Kit, una preparación manual de muestras genéricas 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 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 **cobas z 480 analyzer** mediante los reactivos de amplificación y detección suministrados con el kit de la prueba **cobas PIK3CA**.

Amplificación mediante PCR

Selección de la diana

El kit de la prueba **cobas PIK3CA** utiliza un conjunto de cebadores que definen secuencias de pares de bases específicas con una longitud que oscila entre 85 y 155 pares de bases en los exones 2, 5, 8, 10 y 21 del gen PIK3CA. Un par de cebadores adicional se dirige a una región de 167 pares de bases en el exón 4 del gen PIK3CA para permitir un control completo del proceso de adecuación, extracción y amplificación de las muestras. La amplificación tiene lugar únicamente en las regiones del gen PIK3CA situadas entre los cebadores. No se amplifica el gen PIK3CA entero.

Amplificación de la diana

Para la amplificación de la diana se utiliza un derivado de la ADN polimerasa Z05-AS1 de la especie *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-AS1, en presencia de metal divalente y exceso de dNTP, prolonga los cebadores hibridados, lo que provoca 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 pares de bases diana del gen PIK3CA. 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

La prueba **cobas PIK3CA** utiliza la tecnología de la PCR a tiempo real. Cada sonda oligonucleótida específica para una diana de la reacción se marca con un marcador fluorescente que actúa como emisor (reporter) y una molécula silenciadora (quencher) que absorbe las emisiones de fluorescencia del marcador emisor de una sonda intacta. Durante cada ciclo de amplificación, una sonda complementaria se une a la secuencia de ADN monocatenaria del amplicón y, posteriormente, se escinde por la actividad de la nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa Z05-AS1. Una vez que el marcador emisor se separa del silenciador por la actividad de la nucleasa, es posible medir la fluorescencia con una longitud de onda característica cuando el marcador emisor se excita con el espectro lumínico adecuado. Se utilizan cuatro marcadores emisores distintos para detectar las secuencias PIK3CA diana de la prueba. La amplificación de las secuencias diana del PIK3CA se detecta de manera independiente mediante tres reacciones que miden la fluorescencia en las cuatro longitudes de onda características de los canales ópticos dedicados.

Amplificación selectiva

La amplificación selectiva de la diana de ácido nucleico de la muestra se logra en la prueba **cobas** PIK3CA mediante el uso de la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y el trifosfato de desoxiuridina (dUTP).¹⁴ La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina, pero no del ADN que contiene timidina. El ADN natural carece de desoxiuridina que, sin embargo, está siempre presente en el amplicón debido al uso de dUTP además del trifosfato de desoxitimidina como uno de los trifosfatos del nucleótido en los reactivos de la Master Mix, por lo que solo el amplicón contiene desoxiuridina. La desoxiuridina hace que la enzima AmpErase pueda destruir el amplicón contaminante antes de realizar la amplificación del ADN de la diana. La enzima AmpErase, que se incluye en los reactivos de la Master Mix, cataliza la escisión del ADN que contiene desoxiuridina en la posición de los residuos de desoxiuridina abriendo 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 del ciclo térmico y, por consiguiente, no es capaz de destruir el amplicón de la diana.

Reactivos y materiales

Todos los reactivos y controles sin abrir deben almacenarse como se recomienda en la tabla “Requisitos de almacenamiento y manipulación”.

Reactivos suministrados para la prueba **cobas**® PIK3CA Mutation Test, 24 pruebas (P/N: 07003986190)

Reactivos	Composición del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia
PIK3CA MMX-1 (PIK3CA Master Mix 1; tapón con botón blanco) (P/N: 07003897001)	Buffer Tris, cloruro potásico, glicerol, EDTA, detergente no iónico, sulfóxido de dimetilo, 0,09 % de azida sódica, dNTPs, ADN polimerasa, enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana), aptámero, cebadores para PIK3CA, sondas para PIK3CA marcadas con fluorescencia	2 × 0,48 ml	N/A
PIK3CA MMX-2 (PIK3CA Master Mix 2; tapón con botón dorado) (P/N: 07003927001)	Buffer Tris, cloruro potásico, glicerol, EDTA, detergente no iónico, sulfóxido de dimetilo, 0,09 % de azida sódica, dNTPs, ADN polimerasa, enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana), aptámero, cebadores para PIK3CA, sondas para PIK3CA marcadas con fluorescencia	2 × 0,48 ml	N/A
PIK3CA MMX-3 (PIK3CA Master Mix 3; tapón con botón verde azulado) (P/N: 07003943001)	Buffer Tris, cloruro potásico, glicerol, EDTA, detergente no iónico, sulfóxido de dimetilo, 0,09 % de azida sódica, dNTPs, ADN polimerasa, enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana), aptámero, cebadores para PIK3CA, sondas para PIK3CA marcadas con fluorescencia	2 × 0,48 ml	N/A
MGAC (Acetato de magnesio; tapón con botón amarillo) (P/N: 05854326001)	Acetato de magnesio, 0,09 % de azida sódica	6 × 0,20 ml	N/A
PIK3CA MC (Control de mutación en PIK3CA; tapón con botón rojo) (P/N: 07003960001)	Buffer Tris, EDTA, ARN poli-rA (sintético), 0,05 % de azida sódica, ADN plasmídico con secuencias de los exones 2, 5, 8, 10 y 21 del gen PIK3CA, ADN no mutado de PIK3CA	6 × 0,10 ml	N/A
DNA SD (Diluyente para muestras de ADN) (P/N: 05854474001)	Buffer Tris-HCl, 0,09 % de azida sódica	2 × 3,5 ml	N/A

Requisitos de almacenamiento y manipulación

Reactivo	Temperatura de almacenamiento	Periodo de almacenamiento
cobas® PIK3CA Mutation Test*	Entre 2 °C y 8 °C	Una vez abierto, se mantiene estable para 4 usos durante 90 días o hasta la fecha de caducidad indicada, lo que se produzca primero.

* Los reactivos **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3** y la solución MMX de trabajo (preparada añadiendo **MGAC** a **PIK3CA MMX-1** o a **PIK3CA MMX-2** o a **PIK3CA MMX-3**) deben protegerse de una exposición prolongada a la luz. La mezcla MMX de trabajo debe almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °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. 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.

Material adicional necesario

Materiales	P/N
Lejía	Cualquier proveedor
Etanol al 70 %	Cualquier proveedor
Microplaca (placa de amplificación y detección) y película de sellado para el cobas® 4800 System	Roche 05232724001
Aplicador de película de sellado para el cobas® 4800 System (suministrado con la instalación del cobas® 4800 System)	Roche 04900383001
Pipeteadores ajustables* (capacidad de pipeteo entre 5 y 1.000 µl)	Cualquier proveedor
Puntas exentas de DNasa con filtro para aerosol o de desplazamiento positivo	Cualquier proveedor
Microcentrífuga de mesa de trabajo* (centrifugado a 20.000 × g)	Eppendorf 5430 o 5430R, o equivalente
Tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo (capacidad de 1,5 ml, estériles, exentos de RNasa/DNasa y grado PCR)	Cualquier proveedor
Bandejas de tubos para microcentrífuga	Cualquier proveedor
Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN*	Cualquier proveedor
Agitador vórtex*	Cualquier proveedor
Guantes desechables sin talco	Cualquier proveedor

* Debe realizarse el mantenimiento del equipo de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Equipos y programas necesarios pero no suministrados

Equipos y programas necesarios, no suministrados	P/N
cobas z 480 analyzer y unidad de control	05200881001
Software de la aplicación (core) para el cobas® 4800 System versión 2.2 o superior	07565500001
Software del paquete de análisis cobas® PIK3CA P1 versión 1.0 o superior	08249628001

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial seguir las buenas prácticas de laboratorio recomendadas para obtener un rendimiento correcto del ensayo.

- Para diagnóstico in vitro exclusivamente.
- Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.
- Esta prueba debe utilizarse con muestras FFPET. 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 Laboratories¹⁵ y en el documento M29-A4 del CLSI.¹⁶
- Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipeteador exentas de DNasa.

Buenas prácticas de laboratorio

- No pipetee con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio.
- Lávese a conciencia las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- Utilice guantes de laboratorio, 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.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5 % en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10). A continuación, límpielas con un trapo impregnado en 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 %.

Contaminación

- A fin de evitar la contaminación, es obligatorio el uso de guantes durante la manipulación de las muestras y los reactivos para la prueba cobas PIK3CA, así como cambiarse los guantes entre un proceso y otro. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras.
- Cámbiese los guantes con frecuencia para reducir las posibilidades de contaminación.
- Cámbiese los guantes antes de salir de las áreas de aislamiento de ADN o si entra en contacto con soluciones o una muestra que pudieran estar contaminadas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos.
- El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Los materiales y equipos utilizados deben dedicarse exclusivamente a cada actividad y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra. Por ejemplo, los pipeteadores y suministros para el aislamiento de ADN no deben utilizarse para preparar reactivos para la amplificación y la detección.
- Se recomienda utilizar flujos de trabajo de laboratorio unidireccionales y completar una actividad antes de pasar a la siguiente. Por ejemplo, debe completarse el aislamiento de ADN antes de empezar con el proceso de amplificación y detección. El aislamiento de ADN debe realizarse en una zona distinta de en la que se lleve a cabo la amplificación y la detección. Para evitar la contaminación de la solución Master Mix de trabajo con muestras de ADN, el área de trabajo de amplificación y detección debería limpiarse exhaustivamente antes de la preparación de la Master Mix de trabajo.

Integridad

- No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de kits o lotes distintos.
- No combine viales de reactivos de lotes del kit distintos.
- No utilice elementos desechables caducados.
- Los elementos desechables son de un solo uso. No deben reutilizarse.
- Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Eliminación de residuos

1. Los reactivos **MGAC**, **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3**, **PIK3CA MC** 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.
2. Deseche los reactivos no utilizados y los residuos según la reglamentación nacional, federal, estatal y local.

Limpieza de derrames

- Si el derrame se produce sobre el **cobas® 4800 instrument**, siga las instrucciones de limpieza que se detallan en la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
- No utilice soluciones de hipoclorito de sodio (lejía) para limpiar el **cobas z 480 analyzer**. Limpie el **cobas z 480 analyzer** según los procedimientos detallados en la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
- Si desea conocer las advertencias, precauciones y procedimientos adicionales para reducir el riesgo de contaminación del **cobas z 480 analyzer**, consulte la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.

Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras

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

Recogida de muestras

Las muestras FFPET de cáncer de mama se han validado para su uso con la prueba **cobas PIK3CA**.

Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras

Las muestras FFPET de cáncer de mama se pueden transportar a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C. El transporte de las muestras de FFPET de cáncer de mama debe cumplir las reglamentaciones nacionales, federales, estatales y locales para el transporte de agentes etiológicos.¹⁷

Se ha confirmado la estabilidad de las muestras FFPET de cáncer de mama conservadas a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C durante un máximo de 12 meses tras la fecha de la obtención. Las secciones de 5 µm colocadas en portaobjetos pueden almacenarse a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C hasta 60 días.

Estabilidad de las muestras FFPET de cáncer de mama:

Tipo de muestra FFPET	Bloque de FFPET	Sección de FFPET de 5 µm
Temperatura de almacenamiento para muestras FFPET	Entre 15 °C y 30 °C	Entre 15 °C y 30 °C
Periodo de almacenamiento	Hasta 12 meses	Hasta 60 días

Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas

Estabilidad de las muestras procesadas (ADN extraído):

Temperatura de almacenamiento del ADN extraído	Entre -15 °C y -25 °C	Entre 2 °C y 8 °C	Entre 15 °C y 30 °C
Periodo de almacenamiento	Hasta 3 ciclos de congelación/ descongelación durante 60 días	Hasta 14 días	Hasta 1 día

El ADN extraído debería utilizarse en los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para la extracción del ADN, lo que ocurra primero.

Procedimiento analítico

Realización de la prueba

Ilustración 1 Flujo de trabajo de la prueba cobas PIK3CA con el cobas® DNA Sample Preparation Kit

N.º	Paso del flujo de trabajo
1	Inicie el sistema.
2	Efectúe el mantenimiento del equipo.
3	Extraiga las muestras y los reactivos del almacenamiento.
4	Desparafinice las muestras.
5	Lleve a cabo el aislamiento del ADN.
6	Eluya el ADN.
7	Cree la petición de trabajo e imprima la distribución de la placa.
8	Prepare los reactivos de amplificación.
9	Cargue la placa de amplificación y detección con los reactivos de amplificación.
10	Cargue la placa de amplificación y detección con muestras.
11	Selle la placa de amplificación y detección.
12	Cargue la placa de amplificación y detección en el cobas z 480 analyzer.
13	Inicie la serie analítica.
14	Revise los resultados.
15	Con LIS: envíe los resultados al LIS.
16	Descargue el analizador.

Instrucciones de uso

Nota: la prueba **cobas** PIK3CA solamente admite secciones de FFPE de cáncer de mama con un grosor de 5 µm y que contengan como mínimo un 10 % de células tumorales. Las muestras con menos de un 10 % de células tumorales por área deben someterse a macrodissección después de la desparafinación.

Nota: consulte la Asistencia al usuario del **cobas**® 4800 System para obtener instrucciones de uso detalladas del **cobas z 480 analyzer**.

Tamaño de la serie

Una única serie puede incluir entre 1 y 30 muestras (además de los controles) por cada placa de amplificación y detección de 96 pocillos. Si se analizan más de 24 muestras, será necesario utilizar varios kits de la prueba **cobas** PIK3CA.

La prueba **cobas** PIK3CA contiene reactivos suficientes para realizar 8 series de 3 muestras (además de los controles) para un máximo de 24 muestras por kit.

Controles para todo el proceso

Esta prueba requiere un control negativo para todo el proceso (**NEG**). En cada serie debe procesarse un **NEG** junto con las muestras empezando por el procedimiento de aislamiento de ADN.

Aislamiento de ADN

El ADN se aísla de las muestras FFPE de cáncer de mama 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.

Nota: almacene el stock de ADN según las instrucciones del apartado **Almacenamiento y estabilidad de las muestras durante el transporte**.

1. Mezcle cada stock de ADN mediante un agitador vórtex durante 5 segundos.
2. Cuantifique el ADN mediante un espectrofotómetro, según el protocolo del fabricante. Utilice el buffer de elución de ADN (**DNA EB**) 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 ± 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 ± 2 ng/µl. Si las dos mediciones presentan una diferencia mayor a ± 10 % entre ellas cuando las lecturas de concentración de ADN son $\geq 20,0$ ng/µl o mayor a ± 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 **NEG** procesado.

3. La concentración del stock de ADN de las muestras debe ser ≥ 2 ng/ μ l para realizar la prueba **cobas** PIK3CA. Se realizan tres ciclos de amplificación/detección por muestra, para cada uno de los cuales se utilizan 25 μ l de una dilución de 2 ng/ μ l de stock de ADN (un total de 50 ng de ADN).

Nota: cada stock de ADN debe tener una concentración mínima de 2 ng/ μ l para realizar la prueba **cobas** PIK3CA. Si la concentración de un stock de ADN es < 2 ng/ μ 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 μ 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 buffer de lisis del tejido de ADN (**DNA TLB**) + proteinasa K (**PK**) y lleve a cabo el aislamiento y la cuantificación de ADN tal y como se ha descrito anteriormente. En los casos de las muestras que no están colocadas en portaobjetos, combine ambas secciones en un tubo y lleve a cabo la desparafinación. Sumerja el tejido en **DNA TLB** + **PK** y lleve a cabo el aislamiento y la cuantificación de ADN tal y como se ha descrito anteriormente. Si el stock de ADN sigue siendo < 2 ng/ μ l, solicite otra sección de muestra FFPET al centro clínico correspondiente.

Amplificación y detección

Nota: para evitar la contaminación de las mezclas 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 la Asistencia al usuario del **cobas**® 4800 System para obtener instrucciones detalladas del **cobas z** 480 analyzer.

Configuración de las peticiones de pruebas

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de la prueba **cobas** PIK3CA, consulte la Asistencia al usuario del **cobas**® 4800 System.

Cree un esquema de placas con la posición de todas las muestras y controles de la serie. El control de mutación (MC) se carga en las posiciones A01-A03 de la placa. El **NEG** se carga en las posiciones B01-B03 de la placa. A continuación se añaden las muestras diluidas en conjuntos de 3 columnas, comenzando por C01-C03 hasta H10-H12, tal como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Distribución de la placa para la prueba cobas PIK3CA

Fila/ Columna	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3
B	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3
C	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3
D	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3
E	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3
F	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3
G	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3
H	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3

Donde: MC = Control de mutación, NEG = Control negativo, S n.º = ID de muestra, y MMX n.º = reactivo de Master Mix 1, 2 o 3.

Nota: cualquiera de las muestras debe aparecer en tres columnas consecutivas de una fila para obtener una respuesta.

Nota: la solución Master Mix 1 de trabajo se debe cargar en las columnas 01, 04, 07 y 10 de la placa. La solución Master Mix 2 de trabajo se debe cargar en las columnas 02, 05, 08 y 11 de la placa. La solución Master Mix 3 de trabajo se debe cargar en las columnas 03, 06, 09 y 12 de la placa.

Nota: se pueden cargar hasta 30 muestras en una única placa. Si se necesita más de un kit de reactivo para procesar todas las muestras de la placa, entonces todos los kits deberán pertenecer al mismo lote.

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

Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN entre 2 ng/µl y 36 ng/µl

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

Nota: se realizan tres ciclos de amplificación/detección de cada muestra que requieren un volumen total de 75 µl (25 µl para cada una de las tres reacciones) de una dilución de 2 ng/µl de stock de ADN (un total de 150 ng de ADN).

1. Para cada muestra, se debe calcular el volumen (µl) de stock de ADN necesario:

$$\mu\text{l de stock de ADN} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{concentración de stock de ADN [ng}/\mu\text{l}]$$

2. Para cada muestra, se debe calcular el volumen (µl) de **DNA SD** necesario:

$$\mu\text{l de DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \mu\text{l de stock de ADN}$$

Ejemplo:

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

$$1. \mu\text{l de stock de ADN} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 27,7 \mu\text{l}$$

$$2. \mu\text{l de DNA SD} = (90 \mu\text{l} - 27,7 \mu\text{l}) = 62,3 \mu\text{l}$$

Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN > 36 ng/μl

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

Nota: se realizan tres ciclos de amplificación/detección de cada muestra que requieren un volumen total de 75 μl (25 μl para cada una de las tres reacciones) de una dilución de 2 ng/μl de stock de ADN (un total de 150 ng de ADN).

1. Con concentraciones de stock de ADN > 36 ng/μl, utilice la fórmula siguiente para calcular la cantidad de **DNA SD** necesario para preparar al menos 90 μl de stock de ADN diluido. De esta manera se garantiza que cada muestra utilice como mínimo 5 μl de stock de ADN.
2. Para cada muestra, calcule el volumen de (μl) de **DNA SD** necesario para diluir 5 μl de stock de ADN en 2 ng/μl:

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

Ejemplo:

Concentración de stock de ADN = 100 ng/μl

1. Vol. de **DNA SD** necesario en μl = $[(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$
2. Utilice el volumen calculado de **DNA SD** para diluir 5 μl de stock de ADN.

Dilución de muestras

1. Prepare el número adecuado de tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml para diluciones de ADN etiquetándolos con la identificación de muestra correspondiente.
2. Con un pipeteador equipado con una punta resistente a aerosoles, pipetee los volúmenes calculados de **DNA SD** en los tubos etiquetados correspondientes. Pipetee 45 μl de **DNA SD** en un tubo para microcentrífuga con tapa de bloqueo etiquetado como **NEG**.
3. Mezcle cada stock de ADN y el **NEG** mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.
4. 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 45 μl de **NEG** (elución extraída) en el tubo **NEG**.
5. Tape los tubos y agítelos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.
6. Cámbiese los guantes.

Configuración de las reacciones

Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3)

Nota: las mezclas **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3** y **MMX** de trabajo son sensibles a la luz y se deben proteger de la exposición prolongada a la luz.

Nota: debido a la viscosidad de los reactivos **PIK3CA** y la mezcla **MMX** de trabajo, es importante pipetear con lentitud para asegurar que toda la muestra se dispensa por completo a través de la punta.

Nota: las mezclas **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** y **PIK3CA MMX-3** pueden adquirir un aspecto azul claro/púrpura. Esto no afecta el rendimiento del reactivo.

Prepare tres mezclas **MMX** de trabajo a granel: una con **PIK3CA MMX-1**, otra con **PIK3CA MMX-2** y la tercera con **PIK3CA MMX-3** en tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml individuales.

1. Calcule el volumen de **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** o **PIK3CA MMX-3** necesario para cada solución MMX de trabajo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2 o PIK3CA MMX-3 necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

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

$$\text{Volumen de MGAC necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 7 \mu\text{l}$$

Utilice la Tabla 3 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 3: Volúmenes de reactivos necesarios para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 de trabajo según el número de muestras* analizadas

Reactivo	Volumen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 μl	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	7 μl	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
-	Vol. total para cada MMX de trabajo (μl)	108	135	162	189	216	243	270	297	324	351

* Los volúmenes para el número de muestras se calculan a partir de la suma del número de muestras + 2 controles + 1

3. Retire el número de viales necesarios de **PIK3CA MMX-1/PIK3CA MMX-2/PIK3CA MMX-3** y de **MGAC** de la nevera a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. 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 microcentrífuga estéril para la mezcla MMX-1 de trabajo, MMX-2 de trabajo y MMX-3 de trabajo.
4. Añada el volumen calculado de **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** o **PIK3CA MMX-3** al tubo de MMX de trabajo correspondiente.
5. Añada el volumen calculado de **MGAC** a los tubos de MMX de trabajo.
6. 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 y los controles deben añadirse a la placa de amplificación y detección durante la hora siguiente a la preparación de las mezclas MMX de trabajo.

Nota: utilice únicamente placas de amplificación y detección y películas de sellado para el cobas® 4800 System.

Preparación de la placa

1. 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 MMX-1 de trabajo (que contiene **PIK3CA MMX-1**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 01, 04, 07 y 10, según sea necesario.
 - Añada MMX-2 de trabajo (que contiene **PIK3CA MMX-2**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 02, 05, 08 y 11, según sea necesario.
 - Añada MMX-3 de trabajo (que contiene **PIK3CA MMX-3**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 03, 06, 09 y 12, según sea necesario.

2. Pipetee 25 µl de **PIK3CA MC** en los pocillos **A01**, **A02** y **A03** 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.
3. Con una punta de pipeteador nueva, pipetee 25 µl de **NEG** en los pocillos **B01**, **B02** y **B03** 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 **PIK3CA MC** en los pocillos **A01**, **A02** y **A03**, y un control negativo **NEG** en los pocillos **B01**, **B02** y **B03**. En caso contrario, el **cobas z 480 analyzer** 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.

4. Con puntas de pipeteador nuevas para cada ADN de muestra diluida, añada 25 µl del primer ADN de la muestra a los pocillos **C01**, **C02** y **C03** de la placa de amplificación y detección con una punta nueva para la adición del ADN de la muestra a cada pocillo y mezcle la solución en cada pocillo con una pipeta para aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces. Repita este procedimiento con el ADN diluido de cada muestra y siga la plantilla de la Tabla 2 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.
5. 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.
6. 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 **cobas**® 4800 System para obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo para PIK3CA. Cuando aparezca la ventana emergente “Select test”, seleccione el tipo de flujo de trabajo “PCR Only” y, a continuación, marque la opción “PIK3CA P1” y haga clic en el botón “OK”.

Resultados

Interpretación de los resultados

Nota: la validación de las series y las muestras la lleva a cabo el **cobas® 4800 software**.

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 4.

Tabla 4: Interpretación de los resultados de la prueba cobas PIK3CA

Resultado de la prueba	Resultado de la mutación	Interpretación
Mutation Detected	R88Q	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	N345K	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	C420R	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	E542K	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	E545X (E545A, E545D*, E545G o E545K)	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	Q546X (Q546E, Q546K, Q546L o Q546R)	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	M1043I**	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	H1047X (H1047L, H1047R o H1047Y)	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	G1049R	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	(Puede existir más de una mutación)	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
No Mutation Detected	N/A	No se ha detectado ninguna mutación en las regiones diana del PIK3CA.
Invalid	N/A	El resultado de la muestra no es válido. Repita el análisis de las muestras cuyos resultados no sean válidos según las instrucciones que encontrará en el apartado "Repetición del análisis de las muestras con resultados no son válidos" 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.

* Para el cambio de aminoácido E545D, la prueba solo detecta la mutación c.1635G>T del cambio de nucleótido.

** Para el cambio de aminoácido M1043I, la prueba solo detecta la mutación c.3129G>T del cambio de nucleótido.

Nota: un resultado "No Mutation Detected" no excluye la presencia de una mutación en las regiones diana del PIK3CA 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.

Repetición del análisis de las muestras con resultados no son válidos

1. 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 muestras” del apartado **Amplificación y detección**.
2. Después de realizar la dilución del stock de ADN a 2 ng/μl según las instrucciones del apartado “Dilución de muestras”, continúe con los pasos descritos en el apartado “Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3)” y con el resto de los pasos del procedimiento de amplificación y detección.

Nota: si la muestra sigue siendo no válida después de volver a analizarla o si no había stock de ADN suficiente para preparar otra dilución según el paso A del apartado “Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos”, repita todo el procedimiento de análisis con la misma muestra, empezando por el proceso de desparafinación y aislamiento de ADN con una nueva sección tumoral de FFPE de 5 μm.

Control de calidad y validez de los resultados

Para cada serie de hasta 30 muestras se incluye un juego de **PIK3CA MC** de la prueba **cobas PIK3CA** (pocillos **A01**, **A02** y **A03**) y un **NEG** (pocillos **B01**, **B02** y **B03**) para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 de trabajo. Una serie se considera válida cuando los controles **PIK3CA MC** y **NEG** son válidos. Si un **PIK3CA MC** o **NEG** no son válidos, toda la serie se considera no válida y debe repetirse. 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 de mutación

El resultado del control **PIK3CA MC** debe ser “Valid”. Si los resultados de **PIK3CA 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 **NEG** debe ser “Valid”. Si los resultados de **NEG** no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

Limitaciones del procedimiento

1. Analice solo los tipos de muestras indicados. La prueba **cobas PIK3CA** se ha verificado utilizando muestras FFPE de cáncer de mama.
2. La prueba **cobas PIK3CA** se ha validado únicamente con el **cobas® 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® DNA Sample Preparation Kit** (M/N 05985536190), en estas Instrucciones de uso y en la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
5. Tampoco se han evaluado los efectos de otras variables potenciales como la fijación de muestras.

6. La incorporación de la enzima AmpErase a la Master Mix de la prueba **cobas** PIK3CA 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.
7. El uso de este producto debe limitarse al personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y la utilización del **cobas**® 4800 System.
8. Solamente el **cobas z** 480 analyzer se ha verificado para su uso con este producto. No utilice ningún otro termociclador con detección óptica en tiempo real con este producto.
9. Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que, antes de cambiar de una a otra, realicen estudios de correlación en el laboratorio para determinar las diferencias tecnológicas.
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, las mutaciones en las regiones del ADN genómico del gen PIK3CA cubiertas por los cebadores o las sondas usadas en la prueba **cobas** PIK3CA pueden conducir a un resultado incorrecto.
12. Aunque es poco probable, la prueba **cobas** PIK3CA puede presentar reactividad cruzada limitada (resultados “Mutation Detected”) para las mutaciones que flanquean las mutaciones diana en los exones 10 y 21 (p. ej., con porcentajes elevados de mutación, E545K puede devolver un resultado de mutación de E545X;Q546X o H1047X puede devolver un resultado de mutación H1047X;G1049R).
13. La prueba **cobas** PIK3CA se ha validado 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** PIK3CA es una prueba cualitativa. La prueba no debe utilizarse para realizar mediciones cuantitativas del porcentaje de mutación.
15. Las muestras FFPET de cáncer de mama que contienen ADN degradado pueden afectar la capacidad de la prueba para detectar las mutaciones en PIK3CA.
16. Es posible que las muestras con resultados “No Mutation Detected” contengan mutaciones en PIK3CA que el ensayo no detecta.
17. Aunque es poco probable, las muestras que contienen mutaciones dobles cercanas en la misma cadena de ADN pueden interferir en la detección de una de las dos mutaciones (p. ej., P539R (CCT>CGT) puede interferir en la detección de E542K o Y343Y (TAC>TAT) puede interferir en la detección de N345K).

Evaluación no clínica del rendimiento

Nota: las descripciones del estudio que se muestran a continuación incluyen datos acumulados obtenidos con la prueba cobas PIK3CA.

En los estudios no clínicos que se describen a continuación, el porcentaje tumoral se evaluó mediante revisión patológica. Se utilizaron la secuenciación bidireccional de Sanger y la secuenciación de próxima generación (NGS) para seleccionar las muestras de análisis. El porcentaje de mutación de las muestras FFPE de cáncer de mama se determinó a partir de un método NGS.

Características clave de rendimiento

Sensibilidad analítica – Límite de blanco (LdB)

Para valorar el rendimiento de la prueba cobas PIK3CA y garantizar que las muestras sin mutación no generan una señal analítica que pudiera indicar una concentración baja de la mutación, se evaluaron muestras FFPE PIK3CA de cáncer de mama sin mutación. El LdB se determinó mediante la opción no paramétrica tal como se indica en la directriz EP17-A2¹⁸ del CLSI para muestras sin mutación en PIK3CA. Se determinó que el LdB fuese cero para todas las mutaciones.

Límite de detección con mezclas de muestras FFPE

Se mezclaron extractos de ADN aislado de 33 muestras FFPE de cáncer de mama con mutaciones en PIK3CA con ADN aislado de 25 muestras FFPE de cáncer de mama sin mutación en PIK3CA para obtener 42 mezclas de ADN exclusivas con niveles de mutación del 10,0 %, el 7,5 %, el 5,0 %, el 2,5 % y el 1,0 % según se determinó mediante un método NGS. Se prepararon diluciones de cada mezcla de ADN de muestras y se analizó un total de 21 réplicas de cada nivel de mutación utilizando tres lotes de kit de la prueba cobas PIK3CA (n = 21/miembro del panel). El límite de detección de cada muestra se determinó a partir del porcentaje más bajo de mutación que generó un resultado “Mutation Detected” para PIK3CA de como mínimo un 95 % para la mutación diana, tal y como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Límite de detección de la prueba cobas PIK3CA con mezclas de ADN de muestras FFPET

Exón del PIK3CA	Mutación en PIK3CA	Secuencia de ácidos nucleicos de PIK3CA	ID de COSMIC ¹²	Muestra	Porcentaje de mutación del miembro del panel necesario para obtener una tasa de resultados "Mutation Detected" ≥ 95 % con un volumen inicial de ADN de 50 ng por pocillo de reacción (N = 21 réplicas)
2	R88Q	263 G>A	746	Muestra 1	2,2 %
2	R88Q	263 G>A	746	Muestra 2	1,3 %
2	R88Q	263 G>A	746	Muestra 3	1,1 %
5	N345K	1035 T>A	754	Muestra 4	2,2 %
5	N345K	1035 T>A	754	Muestra 5	1,9 %
5	N345K	1035 T>A	754	Muestra 6	1,3 %
8	C420R	1258 T>C	757	Muestra 7	1,7 %
8	C420R	1258 T>C	757	Muestra 8	1,9 %
8	C420R	1258 T>C	757	Muestra 9	1,6 %
10	E542K	1624 G>A	760	Muestra 10	1,1 %
10	E542K	1624 G>A	760	Muestra 11	1,2 %
10	E542K	1624 G>A	760	Muestra 12	1,1 %
10	E545A	1634 A>C	12458	Muestra 13	2,8 %
10	E545A	1634 A>C	12458	Muestra 14	0,9 %
10	E545A	1634 A>C	12458	Muestra 15	1,6 %
10	E545G	1634 A>G	764	Muestra 16	1,8 %
10	E545G	1634 A>G	764	Muestra 17	1,2 %
10	E545G	1634 A>G	764	Muestra 18	1,6 %
10	E545K	1633 G>A	763	Muestra 19	3,3 %
10	E545K	1633 G>A	763	Muestra 20	1,5 %
10	E545K	1633 G>A	763	Muestra 21	1,8 %
10	Q546E	1636 C>G	6147	Muestra 22	3,5 %
10	Q546E	1636 C>G	6147	Muestra 23	1,6 %
10	Q546E	1636 C>G	6147	Muestra 24	2,5 %
10	Q546K	1636 C>A	766	Muestra 25	3,4 %
10	Q546K	1636 C>A	766	Muestra 26	2,3 %
10	Q546K	1636 C>A	766	Muestra 27	2,7 %
10	Q546R	1637 A>G	12459	Muestra 28	1,5 %
10	Q546R	1637 A>G	12459	Muestra 29	3,2 %
10	Q546R	1637 A>G	12459	Muestra 30	1,3 %
21	H1047L	3140 A>T	776	Muestra 31	2,8 %
21	H1047L	3140 A>T	776	Muestra 32	1,8 %
21	H1047L	3140 A>T	776	Muestra 33	3,3 %
21	H1047R	3140 A>G	775	Muestra 34	2,8 %
21	H1047R	3140 A>G	775	Muestra 35	1,5 %
21	H1047R	3140 A>G	775	Muestra 36	1,0 %
21	H1047Y	3139 C>T	774	Muestra 37	3,5 %
21	H1047Y	3139 C>T	774	Muestra 38	2,2 %
21	H1047Y	3139 C>T	774	Muestra 39	3,4 %
21	G1049R	3145 G>C	12597	Muestra 40	1,0 %
21	G1049R	3145 G>C	12597	Muestra 41	0,7 %
21	G1049R	3145 G>C	12597	Muestra 42	1,0 %

La prueba cobas PIK3CA pudo detectar mutaciones diana en el gen PIK3CA con un nivel de porcentaje de mutación que oscilaba entre el 0,7 % y el 3,5 % con 50 ng/PCR de volumen de ADN inicial.

Detección de genotipos poco frecuentes mediante plásmidos

Para las tres mutaciones en PIK3CA incluidas en la Tabla 6, se mezcló un constructo de ADN plásmido con ADN no mutado para preparar muestras de ADN con bajo porcentaje de mutación. Se analizó un total de como mínimo 20 réplicas de cada mezcla de plásmidos con un volumen de ADN inicial de 50 utilizando como mínimo un lote de kit de la prueba cobas PIK3CA. El límite de confianza superior del 95 % binomial para cada mezcla de plásmido se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Mutaciones detectadas por la prueba cobas PIK3CA mediante mezclas de ADN de plásmidos con mutación

Exón del PIK3CA	Mutación en PIK3CA	Secuencia de ácidos nucleicos de PIK3CA	ID de COSMIC ¹²	Porcentaje de la mutación real	Límite de confianza inferior del 95 % binomial (n ≥ 20)	Límite de confianza superior del 95 % binomial (n ≥ 20)
10	E545D	1635 G>T	765	1,2 %	62 %	97 %
10	Q546L	1637 A>T	25041	2,1 %	83 %	100 %
21	M1043I	3129 G>T	773	2,6 %	83 %	100 %

Repetibilidad

La repetibilidad de la prueba cobas PIK3CA se calculó con diez muestras FFPET entre las que se incluyeron: dos muestras sin mutación y ocho muestras con una mutación (E542K, N345K, E545K, C420R, G1049R, Q546K, R88Q o H1047R). Las muestras se analizaron por duplicado por parte de dos usuarios, utilizando dos lotes de reactivos distintos y dos cobas z 480 analyzers durante ocho días. Se evaluaron 32 réplicas de cada muestra. La prueba cobas PIK3CA presenta una tasa de identificación correcta del 99,7 % (319/320).

Correlación con el método de referencia

Se realizó un análisis de comparación de 206 muestras FFPET de cáncer de mama utilizando dos lotes de la prueba cobas PIK3CA y la secuenciación de Sanger para determinar el porcentaje de concordancia de resultados positivos, negativos y generales entre ambos métodos. Los resultados discordantes entre la prueba cobas PIK3CA y la secuenciación de Sanger se analizaron mediante NGS para resolver la discordancia.

Resultados de la prueba cobas PIK3CA y la secuenciación de Sanger

En la Tabla 7 se muestra la comparación de los 205 resultados válidos para Sanger y para la prueba cobas PIK3CA.

Tabla 7: Análisis de concordancia del ensayo cobas PIK3CA y la secuenciación de Sanger

	Sanger, MD	Sanger, NMD	Total
Prueba cobas PIK3CA, MD	95*	7	102
Prueba cobas PIK3CA, NMD	0	103	103
Prueba cobas PIK3CA, Invalid	0	1	1
Total	95	111	206

Concordancia de resultados positivos = 100 % (IC del 95 % = 96,1-100 %)

Concordancia de resultados negativos = 93,6 % (IC del 95 % = 87,4-96,9 %)

Concordancia general = 96,6 % (IC del 95 % = 93,1-98,3 %)

MD: Mutation Detected

NMD: No Mutation Detected

* Cinco muestras del lote 1 y tres muestras del lote 2 fueron MD tanto por la secuenciación de Sanger como por la prueba cobas PIK3CA, aunque la secuenciación de Sanger detectó la primera mutación pero no la segunda (consulte la Tabla 9).

En la comparación entre la prueba **cobas** PIK3CA y la secuenciación de Sanger se evaluaron nueve dianas para cada muestra. Se realizó un total de 1.845 identificaciones basadas en los resultados de las 205 muestras válidas. En la Tabla 8 se muestra la comparación entre la prueba **cobas** PIK3CA y la secuenciación de Sanger a partir de las identificaciones para el lote 1.

Tabla 8: Comparación por identificaciones de la prueba cobas® PIK3CA y Sanger para el lote 1

	Sanger, R88Q	Sanger, N345K	Sanger, C420R	Sanger, E542K	Sanger, E545X	Sanger, Q546X	Sanger, M1043I	Sanger, H1047X	Sanger, G1049R	Sanger, NMD	Total
Prueba cobas PIK3CA, R88Q	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Prueba cobas PIK3CA, N345K	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Prueba cobas PIK3CA, C420R	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
Prueba cobas PIK3CA, E542K	-	-	-	14	-	-	-	-	-	2	16
Prueba cobas PIK3CA, E545X	-	-	-	-	17	-	-	-	-	2	19
Prueba cobas PIK3CA, Q546X	-	-	-	-	-	8	-	-	-	1*	9
Prueba cobas PIK3CA, M1043I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Prueba cobas PIK3CA, H1047X	-	-	-	-	-	-	-	42	-	7*	49
Prueba cobas PIK3CA, G1049R	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
Prueba cobas PIK3CA, NMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.738	1.738
Prueba cobas PIK3CA, Invalid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9
Total	1	7	3	14	17	8	0	42	3	1.759	1.854

* Los resultados del lote 2 fueron similares a los del lote 1, con la excepción de que hubo dos resultados discordantes menos en el lote 2. Consulte la muestra 8 y la muestra 9 en la Tabla 9.

Análisis de discordancia mediante NGS

Siete resultados de mutación en la muestra fueron discordantes entre la secuenciación de Sanger y la prueba **cobas** PIK3CA. Cinco muestras más fueron concordantes para una mutación, aunque la prueba **cobas** PIK3CA detectó una mutación adicional en cada una. Estas 12 muestras se analizaron mediante NGS y sus resultados se muestran en la Tabla 9. Se realizó un análisis de concordancia revisado según los resultados de NGS. En este análisis, se consideraron concordantes las muestras con resultados de NGS coincidentes con el resultado de la prueba **cobas** PIK3CA.

Tabla 9: Resolución de resultados discordantes mediante NGS

Muestra	Sanger	Prueba cobas PIK3CA, lote 1	Resolución mediante NGS, lote 1**	Prueba cobas PIK3CA, lote 2	Resolución mediante NGS, lote 2**
Muestra 1	NMD	H1047X	H1047R (3,4 % de mutación)	H1047X	H1047R (2,5 % de mutación)
Muestra 2	NMD	E542K	E542K (4,8 % de mutación)	E542K	E542K (3,4 % de mutación)
Muestra 3	NMD	H1047X	H1047R (2,0 % de mutación)	H1047X	H1047R (2,8 % de mutación)
Muestra 4	NMD	E542K	E542K (10,1 % de mutación)	E542K	E542K (8,3 % de mutación)
Muestra 5	NMD	E545X	E545K (4,3 % de mutación)	E545X	E545K (2,2 % de mutación)
Muestra 6	NMD	H1047X	H1047R (5,1 % de mutación); H1047Y (1,1 % de mutación)	H1047X	H1047R (4,1 % de mutación)
Muestra 7	NMD	E545X	E545K (17,2 % de mutación)	E545X	E545K (25,6 % de mutación)
Muestra 8*	H1047L	H1047X; Q546X	Q546K (2,2 % de mutación)	H1047X	N/A
Muestra 9*	Q546R	H1047X; Q546X	H1047R (0,6 % de mutación); H1047Y (0,4 % de mutación)	Q546X	N/A
Muestra 10	C420R	H1047X; C420R	H1047R (0,9 % de mutación)	H1047X; C420R	H1047R (1,1 % de mutación)
Muestra 11	E545K	H1047X; E545X	H1047R (1,7 % de mutación)	H1047X; E545X	H1047R (1,8 % de mutación)
Muestra 12	Q546E	H1047X; Q546X	H1047R (6,7 % de mutación)	H1047X; Q546X	H1047R (5,4 % de mutación)

* Las muestras 8 y 9 obtuvieron resultados discordantes entre el lote 1 y el lote 2. Los resultados del lote 2 fueron concordantes con la secuenciación de Sanger, por lo que no fue necesario realizar una prueba de resolución.

** La NGS se realizó únicamente para la resolución de los exones con el resultado discordante.

Nota: los resultados de la prueba **cobas** PIK3CA para las muestras 8-12 detectaron las mismas mutaciones en PIK3CA que la secuenciación de Sanger, si bien se detectaron y confirmaron mutaciones adicionales mediante NGS.

Tras resolver los resultados discordantes entre la prueba **cobas** PIK3CA y la secuenciación de Sanger mediante NGS, la concordancia general de la prueba **cobas** PIK3CA con secuenciación fue del 100 % en todas las mutaciones diana para cada lote, tal como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: Análisis de concordancia entre la prueba cobas PIK3CA y la secuenciación de Sanger con resolución de discordancias mediante NGS (Sanger+NGS)

	Sanger+NGS, MD	Sanger+NGS, NMD	Total
Prueba cobas PIK3CA, MD	102	0	102
Prueba cobas PIK3CA, NMD	0	103	103
Prueba cobas PIK3CA, Invalid	0	1	1
Total	102	104	206

Concordancia de resultados positivos = 100 % (IC del 95 % = 96,4-100 %)

Concordancia de resultados negativos = 100 % (IC del 95 % = 96,4-100 %)

Concordancia general = 100 % (IC del 95 % = 98,2-100 %)

En la Tabla 11 se muestra la comparación entre la prueba **cobas** PIK3CA y la secuenciación de Sanger con resolución de discordancias mediante NGS a partir de las identificaciones para el lote 1.

Tabla 11: Comparación por identificaciones de la prueba cobas PIK3CA y la secuenciación de Sanger con resolución de discordancias mediante NGS (Sanger+NGS)

	Sanger+ NGS, R88Q	Sanger+ NGS, N345K	Sanger+ NGS, C420R	Sanger+ NGS, E542K	Sanger+ NGS, E545X	Sanger+ NGS, Q546X	Sanger+ NGS, M1043I	Sanger+ NGS, H1047X	Sanger+ NGS, G1049R	Sanger+ NGS, NMD	Total
Prueba cobas PIK3CA, R88Q	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Prueba cobas PIK3CA, N345K	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Prueba cobas PIK3CA, C420R	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
Prueba cobas PIK3CA, E542K	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	16
Prueba cobas PIK3CA, E545X	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	19
Prueba cobas PIK3CA, Q546X	-	-	-	-	-	9*	-	-	-	-	9
Prueba cobas PIK3CA, M1043I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Prueba cobas PIK3CA, H1047X	-	-	-	-	-	-	-	49*	-	-	49
Prueba cobas PIK3CA, G1049R	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
Prueba cobas PIK3CA, NMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.738*	1.738
Prueba cobas PIK3CA, Invalid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9
Total	1	7	3	16	19	9	0	49	3	1.747	1.854

* Los resultados del lote 2 fueron similares a los del lote 1, con la excepción de que se detectaron dos mutaciones menos mediante la prueba **cobas** PIK3CA y Sanger+NGS. Consulte la muestra 8 y la muestra 9 en la Tabla 9. Los resultados del lote 2 obtuvieron dos resultados NMD más y, en consecuencia, una mutación Q546X menos y una mutación H1047X menos.

Reactividad cruzada

Se analizó la reactividad cruzada de las siguientes mutaciones no diana mediante plásmidos en aproximadamente el 50 % de los plásmidos del volumen inicial de ADN genómico: M1043I, M1043V, M1043T, G1049S, G1049A, E542V, E542Q, E545D, E545V, E545Q, Q546P, Q546H y el pseudogén PIK3CA. Estas mutaciones no diana no reaccionaron de forma cruzada (ni interfirieron) con la prueba **cobas** PIK3CA cuando se añadieron a muestras con secuencias de PIK3CA sin mutar y mutado.

Evaluación de posibles sustancias interferentes

Endógenas

Se ha demostrado que los triglicéridos (≤ 37 mM, la concentración más elevada recomendada por el CLSI¹⁹) y la hemoglobina (≤ 2 mg/ml, la concentración más elevada recomendada por el CLSI¹⁹) no interfieren en la detección de la prueba **cobas** PIK3CA cuando la sustancia se añade a las muestras durante el procedimiento de preparación de las muestras. Asimismo, se ha demostrado que las muestras con hasta un 90 % de tejido adiposo no interfieren con la prueba **cobas** PIK3CA.

Sustancias exógenas

Se analizaron los fármacos siguientes en relación con su interferencia en una concentración $3 \times C_{\max}$: letrozol, anastrozol, capecitabina, tamoxifeno, exemestano, everolimus, paclitaxel, docetaxel, ciclofosfamida, doxorubicina y fulvestrant. Se determinó que estos fármacos no interfieren con la prueba **cobas** PIK3CA al añadirlos a las muestras durante el procedimiento de preparación de las muestras.

Tejido necrótico

Se ha demostrado que las muestras FFPE de cáncer de mama con un contenido de hasta el 55 % de mutación en PIK3CA y del 70 % en las muestras sin mutación no interfieren en la identificación de resultados mediante la prueba **cobas** PIK3CA.

Evaluación clínica del rendimiento

Estudio de reproducibilidad clínica

Se realizó un estudio para valorar la reproducibilidad de la prueba **cobas** PIK3CA en 3 laboratorios de análisis (1 interno y 2 externos, con 2 usuarios por laboratorio), con 3 lotes de reactivos y durante 5 días de análisis no consecutivos utilizando un panel de 21 miembros de muestras de ADN obtenidas de secciones de FFPE de muestras tumorales de cáncer de mama sin mutar y con mutaciones obtenidas de repositorios de tejidos comerciales. Este panel incluía mutaciones en los exones 2, 5, 8, 10 y 21, confirmadas mediante secuenciación de ADN. Se realizaron un total de 3.780 pruebas con los 21 miembros del panel en 90 series válidas. Todos los resultados obtenidos fueron válidos. No se obtuvieron resultados “Mutation Detected” para ninguna de las 180 pruebas válidas de los miembros no mutados del panel, lo que supone una concordancia del 100 %. La concordancia fue del 100 % para 19 de los 20 miembros mutados del panel. Para el miembro del panel Exón 10 E545 – LoD, la concordancia fue del 99,4 % (179 de los 180 resultados de la prueba generaron un resultado “Mutation Detected”). En la Tabla 12 se muestran los resultados de concordancia general. El coeficiente de variación (CV) fue < 2 % para todos los miembros del panel de mutación. Para los controles internos, el CV fue < 1,9 %. El porcentaje del CV entre lotes fue < 0,4 % y < 1,9 % intralote.

Tabla 12: Estimaciones generales de concordancia por miembro del panel para el estudio de reproducibilidad

Miembro del panel	Número de pruebas válidas	Concordancia N	% de concordancia (IC del 95%) ^a
No mutado	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 5 N345K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 10 E542K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 10 E545K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 21 H1047L – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 21 G1049R – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 5 N345K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 10 E542K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 10 E545K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 21 H1047L – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 21 G1049R – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 2 R88Q – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 8 C420R – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 10 E545A – LoD	180	179	99,4 (96,9, 100,0)
Exón 10 Q546K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 21 H1047R – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 2 R88Q – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 8 C420R – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 10 E545A – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 10 Q546K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Exón 21 H1047R – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 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”.

^a IC del 95 % = Intervalo de confianza exacto del 95 %.

En resumen, la reproducibilidad de la prueba **cobas** PIK3CA para la identificación de las mutaciones en los exones 2, 5, 8, 10 y 21 del gen PIK3CA en ADN procedente de tejido humano tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina fue excelente y la concordancia fue > 99 % para todas las mutaciones evaluadas en este estudio.

Avisos de resultados

Explicación de los avisos de resultados

El origen de un aviso se indica en el código del mismo, tal como se describe en la Tabla 13.

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	R500
Z*	Analizador	Z1

* Consulte la Asistencia al usuario del **cobas®** 4800 System.

En la Tabla 14 se incluyen todos los avisos de resultados del sistema relevantes para el usuario.

Tabla 14: Lista de los avisos de interpretación de resultados

Código del aviso	Descripción	Acción recomendada
R500-R511	No se ha podido detectar el control de mutación.	Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el algoritmo de determinación de codo ha encontrado un error. Esto podría suceder en caso de un patrón de fluorescencia atípico o con ruido.
R512-R523	No se ha podido detectar el control de mutación.	Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que se ha obtenido un resultado negativo para el control de mutación (es decir, si no se ha añadido ADN de control de mutación a uno o más pocillos).
R524-R535	El control de mutación está fuera de rango.	Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que un valor de codo observado para el control de mutación se encontraba por debajo del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado bajo). Este podría suceder en caso de contaminación del ADN.
R536-R547	El control de mutación está fuera de rango.	Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que un valor de codo observado para el control de mutación se encontraba por encima del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado alto). Esto podría suceder en caso de: <ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo. 2. Error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo a un pocillo de reacción de la placa de amplificación y detección. 3. Error de pipeteo al añadir el control de mutación a un pocillo de reacción de la placa de amplificación y detección.
R548-R559	No se ha podido detectar el control negativo.	Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el algoritmo de determinación de codo ha encontrado un error. Esto podría suceder en caso de un patrón de fluorescencia atípico o con ruido.

Código del aviso	Descripción	Acción recomendada
R560-R571	El control negativo está fuera de rango.	Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que se ha obtenido un resultado positivo para el control negativo (es decir, se ha producido un evento de contaminación).
R572-R583	No se ha podido detectar ninguna diana.	Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el algoritmo de determinación de codo ha encontrado un error. Esto podría suceder en caso de un patrón de fluorescencia atípico o con ruido.
R584-R586, R588-R590, R592-R594, R596-R604	El resultado está fuera de rango.	Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso pueden indicar lo siguiente: <ol style="list-style-type: none"> 1. Se ha observado un valor de codo anormalmente bajo para la muestra. 2. Se ha observado una relación atípica entre el valor de codo de la mutación y el valor de codo del control interno para la muestra.
R587, R591, R595	El control interno está fuera de rango.	Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que se ha observado un valor de codo del control interno anormalmente bajo para la muestra. Este error puede producirse si la mezcla de la PCR está notablemente sobrecargada con ADN genómico concentrado.
R605-R610	No se ha podido detectar el control interno.	Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el resultado del control interno para la muestra no ha sido válido. La ausencia de un resultado de control interno válido sugiere lo siguiente: <ol style="list-style-type: none"> 1. ADN genómico de baja calidad de la muestra. 2. Procesamiento de la muestra inadecuado. 3. Presencia de inhibidores de la PCR en la muestra. 4. Mutaciones poco frecuentes en las regiones del ADN genómico cubiertas por los cebadores y/o las sondas de control interno. 5. Posibilidad de que el ADN de la muestra no se haya añadido a uno o más pocillos. 6. Otros factores.

Información adicional

Características principales del ensayo

Tipo de muestra	Tejido impregnado en parafina y fijado en formalina (FFPET)
Cantidad mínima de muestra necesaria	Sección de FFPET de 5 µm
Sensibilidad analítica	5 % de secuencia de mutación en 50 ng de ADN
Especificidad analítica	100 % de concordancia en la secuenciación
Genotipos detectados	R88Q N345K C420R E542K E545X (E545A, E545D*, E545G o E545K) Q546X (Q546E, Q546K, Q546L o Q546R) M1043I** H1047X (H1047L, H1047R o H1047Y) G1049R

* Para el cambio de aminoácido E545D, la prueba solo detecta la mutación c.1635G>T del cambio de nucleótido.

** Para el cambio de aminoácido M1043I, la prueba solo detecta la mutación c.3129G>T del cambio de nucleótido.

Símbolos

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

Tabla 15: Símbolos utilizados en las etiquetas de los productos de diagnóstico mediante PCR de Roche

	Edad o fecha de nacimiento		Fecha de fabricación
	Software auxiliar		Distribuido por
	Intervalo asignado (copias/ml)		No deben reutilizarse
	Intervalo asignado (UI/ml)		Mujeres
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Para evaluación del rendimiento IVD únicamente
	Hoja de datos del código de barras		Global Trade Item Number (número mundial de un artículo comercial)
	Código de serie		Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Riesgo biológico		Límite inferior del intervalo asignado
	Número de catálogo		Hombres
	Fecha de recogida		Fabricante
	Consulte las instrucciones de uso		Control negativo
	Suficiente para $\langle n \rangle$ pruebas		Sin esterilizar
	Contenido del kit		Número del paciente
	Control		Nombre del paciente



Abrir aquí



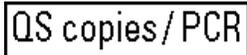
Este lado hacia arriba



Control positivo



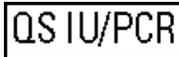
Identificación exclusiva del dispositivo



Copias QS por reacción de PCR, utilice copias QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.



Procedimiento ultrasensible



UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.



Límite superior del intervalo asignado



Número de serie



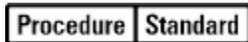
Línea de llenado de orina



Centro

Rx Only

Solamente para EE. UU.: la ley federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.



Procedimiento estándar



Fecha de caducidad



Esterilizado con óxido de etileno



Dispositivo para pruebas cerca del paciente



Almacenar en la oscuridad



Dispositivo no apto para pruebas cerca del paciente



Límite de temperatura



Dispositivo para autoexamen



Archivo de definición de pruebas



Dispositivo no apto para autoexamen



Marcado CE de conformidad; este dispositivo cumple con los requisitos aplicables para el marcado CE de un producto sanitario para diagnóstico *in vitro*

Asistencia técnica

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con su filial local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

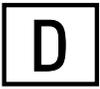
Fabricante y distribuidores

Tabla 16: Fabricante y distribuidores



Fabricado en los Estados Unidos

Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Strasse 116
 68305 Mannheim, Germany
www.roche.com



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

Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Strasse 116
 68305 Mannheim, Germany

Marcas registradas y patentes

Consulte la página <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Copyright

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografía

1. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:1075-83. PMID: 20085938.
2. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:615-75. PMID: 11687500.
3. Workman P, Clarke P. P13 Kinase in Cancer: From Biology to Clinic. ASCO 2012 Educational Book. Available at: https://ascopubs.org/doi/pdf/10.14694/EdBook_AM.2012.32.89. Accessed September 3, 2020.
4. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*. 2005;7:561-73. PMID: 15950905.
5. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:489-501. PMID: 12094235.
6. van der Heijden MS, Bernards R. Inhibition of the PI3K pathway: hope we can believe in? *Clin Cancer Res*. 2010;16:3094-9. PMID: 20400520.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69-90. PMID: 21296855.
8. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304:554. PMID: 15016963.
9. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68:6084-91. PMID: 18676830.
10. Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA oncology*. 2019;5:1749-68. PMID: 31560378.
11. Mackay J, Jemal A, Lee NC, Parkin DM. The Cancer Atlas. Atlanta, Georgia: American Cancer Society; 2006.
12. Bamford S, Dawson E, Forbes S, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer*. 2004;91:355-8. PMID: 15188009.
13. LRG. LRG_310 – Gene: PIK3CA. Available at: http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/LRG_310.xml. Accessed September 3, 2020.
14. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
15. Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
17. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 61st Edition. 2020.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Wayne, Pennsylvania: Clinical Laboratory Standards Institute; 2012.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline–Second Edition. CLSI Document EP7-A2E Appendix D. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

Revisión del documento

Información de revisión del documento	
Doc Rev. 1.0 09/2020	Primera publicación.