

TheraScreen®

molecular diagnostics
for personalised medicine

TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit

Para a detecção de 7 mutações no gene K-RAS

Para utilização no Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR System
(Instrument II)

(N.º de Catálogo: 05015278001)

E no Applied BioSystems 7500 Real-Time PCR System

(Número de referência: 4351105)

Inclui o manual do utilizador do LightCycler® Adapt Software v1.1
da Roche Diagnostics (N.º de Catálogo 05474914001) para
o TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit CE-IVD

Instruções de utilização

Códigos dos produtos

Tamanho do kit	Código do produto DxS	Número de encomenda da Roche Diagnostics
20 reacções	KR-21	05366216190
80 reacções	KR-22	05366224190

Versão das instruções: DU001g

Data da revisão: maio de 2009

Armazenar entre -18°C e -25°C



Índice

1. Utilização prevista / Instruções de utilização	3
2. Resumo e explicação do teste	3
3. Princípios tecnológicos	4
4. Reagentes.....	6
5. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES	7
6. Armazenagem, estabilidade e condições de transporte.....	9
7. Equipamento	9
8. Amostras	9
9. Protocolo K-RAS para a detecção de mutações.....	14
10. Limitações do teste	27
11. Características de desempenho dos ensaios	28
12. Assistência técnica	36
13. Informações sobre o fabricante e os distribuidores	37
14. Data de emissão da última revisão	37
15. Referências	38
Notas para o comprador:.....	40

⚠ IMPORTANTE: Leia atentamente estas instruções e familiarize-se com todos os componentes do Kit K-RAS antes de utilizá-lo.

1. Utilização prevista / Instruções de utilização

Utilização prevista

O DxS TheraScreen®: O K-RAS Mutation Kit (K-RAS Kit) é um teste de diagnóstico *in vitro* que serve para detectar sete mutações somáticas do oncogene K-RAS e proporciona uma avaliação qualitativa do estado da mutação. O Kit K-RAS deve ser utilizado por profissionais de laboratório com a devida formação, num ambiente de laboratório com amostras de ADN extraídas de tecido colorrectal envolvido em parafina e fixado em formalina.

Indicações de utilização

Os resultados do teste do Kit K-RAS servem para ajudar o médico a identificar doentes com cancro colorrectal que não possam beneficiar de terapia de receptor de factor de crescimento anti-epidérmico (EGFR, epidermal growth factor), como o panitumumab ou o cetuximab.

O Kit K-RAS não se destina a diagnosticar cancros colorrectais. É utilizado como auxiliar de outros factores de prognóstico relevantes utilizados para seleccionar doentes adequados para o tratamento com terapias anti-EGFR, com base no estado de mutação do doente em causa. O estado de mutação do doente será tomado em consideração por um médico, juntamente com outros factores de doença, para formular uma decisão terapêutica. Nenhuma decisão sobre o tratamento de doentes com cancro se deve basear apenas no estado de mutação K-RAS.

2. Resumo e explicação do teste

O Kit K-RAS é um dispositivo de diagnóstico com marca CE, em conformidade com a Directiva da União Europeia 98/79/CE para Dispositivos Médicos de Diagnóstico *in vitro*.

Os cancros humanos apresentam frequentemente mutações do oncogene K-RAS⁽¹⁻⁴⁾. A presença destas mutações correlaciona-se com uma falta de reacção a certas terapias carcinógenas do inibidor do factor EGFR, em doentes com cancros colorrectais metastáticos⁽⁵⁻¹⁰⁾⁽¹⁴⁻²¹⁾.

A detecção das sete mutações do gene K-RAS é possível num fundo de ADN genómico de tipo selvagem, num ensaio por PCR em tempo real baseado na tecnologia DxS Scorpions®. Este método é altamente selectivo. Desde que existam suficientes cópias de ADN, é possível a detecção de cerca de 1% de mutante num fundo de ADN genómico de tipo selvagem.

O Kit K-RAS detecta sete mutações do K-RAS nos códons 12 e 13 do oncogene K-RAS, conforme indicado no Quadro 1.

Quadro 1: Mutações do K-RAS detectadas pelo Kit DxS

As identidades cósmicas são obtidas do Catálogo de Mutações somáticas no cancro

<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>

Mutação	Mudança de base	Identidade cósmica
Gly12Ala	(GGT>GCT)	522
Gly12Asp	(GGT>GAT)	521
Gly12Arg	(GGT>CGT)	518
Gly12Cys	(GGT>IGT)	516
Gly12Ser	(GGT>AGT)	517
Gly12Val	(GGT>GTT)	520
Gly13Asp	(GGC>GAC)	532

3. Princípios tecnológicos

O Kit K-RAS combina duas tecnologias, a ARMS® e a Scorpions® (11, 12, 13), para detectar mutações em ensaios por PCR em tempo real.

ARMS

A amplificação específica do alelo ou mutação é obtida por ARMS. A polimerase *Taq* do ADN é extremamente efectiva na sua distinção entre uma correspondência e uma não correspondência na extremidade de 3' de um iniciador da PCR. Sequências mutadas específicas podem ser amplificadas de forma selectiva, mesmo nas amostras em que a maioria das sequências não exiba a mutação, pois:

- Quando se consegue uma correspondência total com o iniciador, a amplificação tem lugar com toda a eficácia.
- Quando a base de 3' não encontra correspondência, apenas ocorre amplificação de fundo de baixo nível.

Scorpions

A detecção da amplificação é realizada com Scorpions. As moléculas tipo Scorpions são moléculas bifuncionais que contêm um iniciador da PCR ligado de forma covalente a uma sonda. O fluoróforo integrado nesta sonda interage com um supressor, também incorporado na sonda, o que reduz a fluorescência.

Durante uma reacção PCR, quando a sonda se liga ao amplicon, o fluoróforo e o supressor separam-se. Isto origina um aumento da fluorescência do tubo de reacção.

Análise dos dados: Método de Δ Ct

Os ensaios de Scorpions em tempo real utilizam o número de ciclos de PCRs necessários para detectar um sinal fluorescente acima de um sinal de fundo, como uma determinação das moléculas alvo presentes no início da reacção. O ponto no qual o sinal é detectado acima da fluorescência do fundo é denominado o "limiar do Ciclo" (Ct, Cycle threshold).

Os valores ΔCt da amostra são calculados como sendo a diferença entre o Ct do ensaio de mutação e o Ct do ensaio de controlo da mesma amostra. As amostras são classificadas como tendo mutação positiva se tiverem valores de ΔCt inferiores ao valor ΔCt de 1% desse ensaio.

Acima deste valor, a amostra poderá conter menos do que 1% de mutação (para além do limite dos ensaios), ou a amostra poderá ser negativa à mutação.

Quando se utilizam iniciadores ARMS, pode ocorrer alguma iniciação ineficaz, originando um Ct de fundo muito retardado, de ADN que não contém uma mutação. Todos os valores ΔCt calculados a partir da amplificação de fundo serão superiores aos valores ΔCt de 1%, e a amostra será classificada como negativa à mutação.

O Kit K-RAS tem marca CE para utilização de diagnóstico *in vitro* no Roche Diagnostics LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Instrument II) (LightCycler® 480 Instrument) de formato de 96 poços, número de referência Roche: 05015278001 ou no Applied BioSystems 7500 Real-Time PCR System, número de referência 4351105 (ABI7500).

Para o LightCycler® 480 Instrument, o Kit K-RAS deve ser utilizado em combinação com o LightCycler® Adapt Software v1.1 para o TheraScreen® K-RAS Mutation Kit CE-IVD (LightCycler® Adapt Software). Este software foi concebido para automatizar a determinação de um traçado de amplificação positivo ou negativo e calcular a um limiar adequado a partir do qual se obtêm valores Ct. Estes são utilizados para calcular valores ΔCt da amostra, que são comparados com os valores de cut-off de 1%. O software indica um resultado de mutação positivo ou negativo e remove qualquer subjectividade da análise e interpretação dos dados do Kit K-RAS

Formato do Kit K-RAS

O Kit K-RAS é fornecido com oito ensaios.

- Um ensaio de controlo.
- Sete ensaios de mutação.

Todas as misturas de reacção contêm um ensaio de controlo exógeno (controlo interno) etiquetado com HEX (para ser detectado pelo detector JOE no ABI7500). Este controla a presença de inibidores que podem dar origem a resultados falso-negativos.

Ensaio de controlo

O ensaio de controlo, etiquetado com FAM, é utilizado para avaliar o ADN total de uma amostra. Este ensaio de controlo amplifica uma região do exão 4 do gene K-RAS.

Os iniciadores e a sonda foram concebidos para evitar quaisquer polimorfismos conhecidos do K-RAS.

Ensaio de mutação

Cada ensaio de mutação, etiquetado com FAM, contém um Scorpion e um iniciador ARMS, para discriminação entre o ADN de tipo selvagem e o ADN mutante detectado por um ensaio de PCR em tempo real.

4. Reagentes

Este Kit K-RAS contém reagentes suficientes para efectuar a avaliação de qualidade das amostras e executar os ensaios K-RAS para até 20 ou 80 reacções, consoante o tamanho do kit.

Tamanho do kit	Código do produto DxS	Número de encomenda da Roche Diagnostics
20 reacções	KR-21	05366216190
80 reacções	KR-22	05366224190

O número de amostras que podem ser testadas depende do tamanho do lote da amostra.

Quadro 2: Conteúdo do Kit K-RAS

Reagentes fornecidos	20 reacções	80 reacções	Tubo
	Volume	Volume	
Mistura da reacção de controlo	1300 µl	5200 µl	1
Mistura de reacção 12ALA	650 µl	2600 µl	2
Mistura de reacção 12ASP	650 µl	2600 µl	3
Mistura de reacção 12ARG	650 µl	2600 µl	4
Mistura de reacção 12CYS	650 µl	2600 µl	5
Mistura de reacção 12SER	650 µl	2600 µl	6
Mistura de reacção 12VAL	650 µl	2600 µl	7
Mistura de reacção 13ASP	650 µl	2600 µl	8
Padrão misturado	300 µl	1000 µl	9
Polimerase <i>Taq</i> do DNA	60 µl	240 µl	10

Equipamentos e reagentes não fornecidos com o Kit K-RAS

O utilizador necessitará dos seguintes equipamentos e consumíveis:

- O LightCycler® 480 Instrument ou a ABI7500 Real-time PCR Machine, com capacidade de ciclagem conforme definido na Secção 9; Protocolo K-RAS para a detecção de mutações.
- O LightCycler® Adapt Software v1.1 da Roche Diagnostics (N.º de Catálogo 05474914001).
- Placas de PCR de 0,2 ml isentas de DNase (LightCycler® 480 Instrument Multiwell Plate 96, número de catálogo 04729692 001, ou ABI MicroAmp Optical 96-well reaction Plate, número de referência 4306737, com MicroAmp Optical Adhesive Film, número de referência 4311971).
- Tubos esterilizados para a preparação de misturas principais.

- Pipetas de uso exclusivo para a preparação de misturas de PCR.
- Pipetas de uso exclusivo para distribuir o modelo de ADN.
- H₂O esterilizada, isenta de nuclease.

5. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- ❖ Apenas para utilização de diagnóstico *in vitro*.
- ❖ O Kit K-RAS não se destina a diagnosticar ou analisar a presença de qualquer tipo de cancro, incluindo o cancro colorrectal. É utilizado como auxiliar de outros factores de prognóstico actualmente utilizados para seleccionar doentes elegíveis que não beneficiariam de tratamentos anti-EGFR do cancro.
- ❖ O tratamento de doentes com cancro não se deve basear apenas no estado de mutação do gene K-RAS. O médico deve tomar em consideração o estado de mutação do doente juntamente com outros factores da doença.
- ❖ O conteúdo do Kit K-RAS pode ser congelado/descongelado até 8 vezes sem se verificar um efeito adverso no desempenho do ensaio. NÃO congelar/descongelar mais de 8 vezes os reagentes do Kit K-RAS.
- ❖ Tenha em atenção que as amostras de tumores são não homogéneas e os dados de uma amostra de um tumor podem não condizer com os dados de outras secções do mesmo tumor. As amostras de tumor podem ainda conter tecido não tumoral. Não se prevê que o ADN de tecido não tumoral contenha as mutações de K-RAS detectadas pelo Kit K-RAS.
- ❖ Todos os ensaios do Kit K-RAS geram produtos de PCR curtos. Contudo, o Kit K-RAS não funciona em ADN altamente fragmentado.
- ❖ A avaliação do ADN deverá basear-se na PCR e poderá diferir da quantificação baseada em leituras de Densidade Óptica. O kit inclui quantidades adicionais da mistura da reacção de controlo, para permitir a avaliação da qualidade e quantidade do ADN nas amostras antes de executar o Kit K-RAS.
- ❖ Os reagentes do Kit K-RAS foram diluídos a uma concentração ideal. Não se recomenda a diluição adicional do reagente, a qual poderia resultar numa redução do seu desempenho. Não é recomendável a utilização de volumes inferiores a 25 µl, que aumentariam o risco de falsos negativos.
- ❖ Todos os reagentes do Kit K-RAS foram formulados especificamente para serem utilizados com os testes indicados. Para se manter um nível de desempenho óptimo, não se devem substituir os reagentes do Kit K-RAS.

- ❖ Para assegurar um nível ideal de actividade e desempenho, os iniciadores Scorpions (tal como todas as moléculas etiquetadas com fluorescência) devem ser sempre protegidos da luz para evitar a sua foto descoloração.
- ❖ Tenha muito cuidado para evitar a contaminação das reacções PCR com o material de controlo sintético. Recomenda-se a utilização de pipetas separadas, de uso exclusivo, para preparar as misturas de reacção e adicionar o modelo de ADN. A preparação e distribuição das misturas de reacção devem ser efectuadas numa área diferente daquela onde se adiciona o modelo. Os tubos nunca devem ser abertos após uma reacção PCR.
- ❖ Cada ensaio incluído no Kit K-RAS tem as suas próprias características. Os cálculos do resultado devem ser efectuados em termos dos parâmetros correctos do ensaio (consultar a secção Interpretação de dados/relatórios).
- ❖ Os valores Ct de mutação de 38 ou mais devem ser classificados como negativos ou abaixo dos limites do kit.
- ❖ Os ensaios contêm uma reacção de controlo exógena (controlo interno) para além da reacção de interesse (consultar a secção "Princípios tecnológicos"). Se ambos os ensaios tiverem falhado, os dados devem ser eliminados pois poderão haver inibidores presentes que podem originar resultados falso-negativos. A diluição da amostra pode reduzir o efeito dos inibidores, mas tenha em atenção que a mesma também diluiria o ADN.
- ❖ Devem ser adoptadas precauções gerais de laboratório, tais como (mas não apenas) as seguintes:
 - a) Não pipete com a boca
 - b) Não fume, não coma e não beba em áreas onde amostras ou reagentes do kit estejam a ser manipulados
 - c) Lave as mãos depois de efectuar o teste
- ❖ Utilize apenas a polimerase *Taq* (*Taq*) fornecida no kit; não substitua por *Taq* de outros kits do mesmo tipo ou de qualquer outro, ou por *Taq* de outro fornecedor.
- ❖ Descongele apenas os reagentes necessários para cada execução; não descongele o kit todo de cada vez, a fim de minimizar o número dos ciclos de congelamento/descongelamento.

Informações de segurança

Atenção: Todos os produtos químicos e materiais biológicos devem ser considerados potencialmente perigosos. As amostras são potencialmente infecciosas e devem ser tratadas como tal.

O Kit K-RAS só deve ser utilizado por pessoas que tenham recebido formação sobre as técnicas de laboratório apropriadas.

Quando trabalhar com os componentes deste Kit K-RAS, deve utilizar sempre uma bata de laboratório, luvas descartáveis e óculos de segurança apropriados. Depois de utilizados, os componentes do Kit K-RAS devem ser eliminados como desperdícios clínicos.

6. Armazenagem, estabilidade e condições de transporte

Armazenagem

Todos os componentes deste Kit K-RAS devem ser armazenados, logo após terem sido recebidos, a uma temperatura de -18°C a -25°C , no escuro, num congelador de temperatura constante. Evite descongelar desnecessariamente os componentes congelados do Kit K-RAS.

Estabilidade

Não utilize o Kit K-RAS após o prazo de validade indicado. O conteúdo do Kit K-RAS permanecerá estável até à data do prazo de validade, quando armazenado nas condições de armazenagem recomendadas e na sua embalagem original.

O conteúdo do Kit K-RAS pode ser congelado/descongelado até 8 vezes sem se verificar um efeito adverso no desempenho do ensaio. NÃO congelar/descongelar mais de 8 vezes os reagentes do Kit K-RAS.

Condições de transporte

O conteúdo do Kit K-RAS foi expedido em gelo seco e deve chegar ao seu destino em estado ainda congelado. Se o Kit K-RAS não chegar ao destino em estado congelado, se a embalagem exterior tiver sido aberta durante o transporte, se a remessa não contiver uma nota de embalagem, instruções de utilização ou os reagentes, contacte o seu distribuidor local da Roche Diagnostics; para os dados de contacto, consulte a secção 12, Assistência técnica.

7. Equipamento

Para as instruções completas sobre a preparação e utilização do equipamento de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do equipamento.

8. Amostras

O material das amostras deve ser ADN genómico humano, extraído de amostras de tumores colorrectais envolvidas em parafina e fixadas em formalina.

Colheita e preparação de amostras

1. Transporte das amostras: Metodologia de patologia normal, para assegurar a qualidade das amostras.
2. Processo recomendado de extracção das amostras: Extracção de ADN, utilizando o kit de tecido Qiagen QIAamp® DNA FFPE (número de catálogo 56404).

Devem ser utilizadas as seguintes emendas ao protocolo Qiagen:

- Secções de FFPE devem ser colhidas para lâminas de vidro.
- O excesso de parafina deve ser raspado de ao redor das secções de tecido utilizando um bisturi esterilizado fresco.
- Raspe o material de secção de tecido para micro tubos de centrifugação, utilizando um bisturi diferente para cada amostra a extrair.
- A digestão de Proteinase K deve continuar até à conclusão. Isto poderá demorar até 48 horas.
- As amostras devem ser eluídas em 200 µl de tampão ATE do kit de extracção de Qiagen.

Quaisquer métodos alternativos de preparação de amostras têm de ser validados pelo utilizador final.

3. Armazenamento do ADN extraído: Armazenar a -20°C, antes da análise.

Protocolo de avaliação de amostras

A mistura de ensaio de controlo suplementar fornecida com o Kit K-RAS deve ser utilizada para avaliar o ADN total de uma amostra. O ensaio de controlo amplifica uma região do exão 4 do gene K-RAS. Devem ser preparadas amostras com apenas o ensaio de controlo utilizando o padrão misturado como um controlo positivo e a água como o controlo sem modelo (NTC). Tenha em atenção que para obter uma utilização ideal dos reagentes do Kit K-RAS, as amostras deverão estar em lotes. Todas as execuções experimentais devem conter controlos. Se as amostras forem testadas individualmente, serão utilizados mais reagentes e diminuirá o número de amostras que podem ser testadas com o Kit K-RAS.

Protocolo de avaliação de amostras - Configuração da placa

1. Descongele à temperatura ambiente a mistura da reacção de controlo e o padrão misturado do Kit K-RAS. Uma vez que descongeladas, misture cada uma das soluções invertendo cada tubo 10 vezes, para evitar concentrações de sais localizadas. Prepare misturas suficientes para as amostras de ADN, uma reacção de padrão misturado e uma reacção de controlo sem modelo (NTC), mais 2 reacções adicionais.
2. Para preparar a mistura principal, utilize as quantidades de reagentes por reacção conforme indicado no Quadro 3.

Quadro 3: Volumes de mistura principal do ensaio de controlo

Ensaio	Mistura principal	
	Mistura de reacção (µl) x1	Taq (µl) x1
Ensaio de controlo	19,8	0,2

3. NÃO misture com agitação forte a *Taq*, ou quaisquer misturas de reacção que contenham *Taq*, pois poderia causar a desactivação da enzima.
4. Certifique-se de que a *Taq* está à temperatura ambiente antes de ser utilizada. Vire o frasco para se assegurar que toda a *Taq* fica no fundo do frasco e, em seguida, pipete colocando a ponta da pipeta logo abaixo da superfície da *Taq*, a fim de minimizar o risco de revestir a ponta com um excesso de *Taq*.
5. Misture a mistura principal, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo.
6. Acrescente imediatamente 20 µl da mistura principal de controlo a cada um dos poços de reacção.
7. Acrescente imediatamente aos poços de reacção 5 µl de amostra, padrão misturado ou água (para os controlos sem modelo (NTC)).
8. A placa deve ser configurada com o padrão misturado adicionado ao poço A1 e o controlo sem modelo (água) adicionado ao A2. Todos os outros poços em utilização devem conter as amostras.
9. Vede e rode com brevidade a placa da PCR para assegurar a concentração dos reagentes no fundo dos poços.
10. Siga a configuração do equipamento para a plataforma adequada.

Protocolo de avaliação de amostras - Configuração do LightCycler® 480 Instrument

1. Coloque imediatamente a placa no LightCycler® 480 Instrument.
2. Selecione o ícone do LightCycler® 480 Software no ambiente de trabalho da estação de trabalho ligada ao equipamento. Inicie sessão no software e, a partir do ecrã 'Overview', selecione 'New Experiment from Template'. A partir dos modelos de execução apresentados, escolha 'K-RAS LC480II Run Template'. Este modelo terá os seguintes parâmetros:
 1. O formato de detecção é 'DxS IVD Assays'.
 2. O volume de reacção é 25.
 3. Um passo de espera inicial a 95°C durante 4 minutos.
 4. Uma amplificação de 2 passos para 45 ciclos, com uma desnaturação a 95°C durante 30 segundos e uma "annealing" a 60°C durante 1 minuto. A aquisição de fluorescência é uma aquisição única no passo dos 60°C.

3. Seleccione o separador 'Sample Editor' e, em 'Step 1: Select Workflow', seleccione a caixa de verificação 'Abs Quant'. Em 'Select Filter Combinations', certifique-se de que ambos os filtros estão seleccionados (465-510 nm e 533-580 nm). Defina os nomes das amostras no Passo 2 e Passo 3. O 'Quantification Sample Type' deverá ser definido para 'unknown' (desconhecido). A coluna de réplicas deverá ser deixada em branco.
4. Seleccione o botão 'Experiment' e clique no botão 'Start Run' para guardar o ensaio e iniciar a ciclagem.
5. Ao concluir a execução, seleccione o separador 'Analysis' e escolha 'Abs Quant/2nd Derivative Max' a partir da janela 'Create New Analysis'. Aceite os valores predefinidos do ecrã 'Create New Analysis'. Certifique-se de que o botão 'Filter Comb' é '465-510' e seleccione o botão 'Calculate'. Os valores Ct são apresentados no quadro 'Samples'.
6. Seleccione o botão 'Filter Comb' e altere os filtros para 533-580 nm. Seleccione o botão 'Calculate' e obtenha os valores Ct de controlo exógeno a partir do quadro 'Samples'.

Protocolo de avaliação de amostras - Configuração do ABI7500 Instrument

1. Coloque imediatamente a placa no equipamento ABI7500.
2. Seleccione o ícone do 7500 System Software no ambiente de trabalho da estação de trabalho ligada ao equipamento. Abra um novo ficheiro de execução a partir do menu File no 7500 Sequence Detection Software versão 1.4.
3. Em 'Assay', seleccione 'Standard Curve (Absolute Quantification)'. Em 'Run Mode', seleccione 'Standard 7500'.
4. Desloque-se para a janela de configuração do detector, seleccionando o botão 'Next'. Adicione à lista de detectores um detector JOE e um FAM, com os supressores definidos para 'none'. Se estes detectores ainda não existirem, seleccione o botão 'New Detectors' e defina um detector FAM e um JOE com o supressor definido para 'none'.
5. Defina 'Passive Reference' para 'None' e seleccione o botão 'Next'.
6. Seleccione a placa inteira e marque as caixas de verificação para os detectores FAM e JOE para garantir que ambos os corantes são monitorizados em cada poço. Seleccione o botão 'Finish'.
7. No separador 'Instrument', defina a ciclagem conforme indicado no Quadro 4.

Quadro 4: Condições de ciclagem do ABI7500

Temperatura	Tempo	Ciclos	Recolha de dados
Fase 1			
95°C	4 min.	1	
Fase 2			
95°C	30 seg.		
60°C	1 min.	40	FAM, JOE

8. Seleccione o botão 'Start' para guardar o ensaio e iniciar a ciclagem.
9. Ao concluir a execução, certifique-se de que a referência passiva está definida para 'none' no ecrã de inspector de poços. No separador do Amplification Plot seleccione todos os poços em utilização e seleccione o corante JOE a partir do menu de lista pendente de detectores.
10. Verifique o sinal JOE de cada amostra e compare ao sinal JOE do poço de NTC (controlo sem modelo). Repare em todas as amostras que têm uma curva de amplificação atrasada ou que falharam a amplificação para o controlo exógeno conforme comparado com o NTC.
11. No separador Amplification Plot, seleccione todos os poços em utilização e seleccione o corante FAM a partir do menu de lista pendente de detectores. Utilize a definição da linha de base automática e o Ct manual e, em seguida, defina manualmente o limiar no meio da fase exponencial, utilizando a escala logarítmica para o eixo Y, conforme descrito no guia do utilizador do ABI7500.
12. Seleccione o botão 'Analyse' para obter os valores Ct.

Interpretação da avaliação de amostras

Avalie os valores Ct de NTC para se certificar de que não existe contaminação que cause uma amplificação positiva no canal FAM (Ct inferior a 40) ou uma reacção de controlo exógeno falhada no canal HEX (sem Ct), indicando um problema de configuração. O padrão misturado deverá dar um Ct de ensaio de controlo (canal FAM) de 26-29 no ABI7500 e ≤ 29 no LightCycler® 480 Instrument. Os dados não deverão ser utilizados se falhar qualquer um destes 2 controlos de execução.

Ct de ensaio de controlo 29-35: Interprete com cuidado, uma vez que mutações de nível muito baixo poderão não ser detectadas.

Ct de ensaio de controlo 35-38: Apenas algumas cópias amplificáveis de ADN estão presentes em tais amostras, e as mutações provavelmente só poderão ser visualizadas se a maioria das cópias tiver sofrido mutação.

Ct de ensaio de controlo ≥ 38 : Rejeite a amostra, uma vez que está presente ADN mínimo, e o Kit K-RAS não poderá detectar mutações.

Tenha em atenção que se uma amostra originar um Ct de ensaio de controlo atrasado, o Ct do controlo exógeno da amostra deverá ser comparado com o controlo exógeno do NTC. Se o controlo exógeno da amostra for atrasado ou negativo, quando comparado com o NTC, poderá estar presente um inibidor. É possível reduzir o efeito de um inibidor diluindo a amostra, embora isto também dilua o ADN.

Diluição de amostra: Um Ct de controlo < 24 irá sobrecarregar os ensaios de mutação. As amostras com um Ct de controlo < 24 devem ser diluídas. De notar que, para o LightCycler® 480 Instrument, os valores Ct obtidos através do 2º método derivativo poderão ser ligeiramente diferentes dos obtidos com o LightCycler® Adapt Software. Recomenda-se que as amostras concentradas sejam diluídas para ficarem dentro do intervalo > 24 mas < 29 (valores Ct baseados no 7500 Sequence Detection Software ou no LightCycler® 480 Instrument Software) utilizando a base de que diluindo ½ aumentará o Ct em 1.

9. Protocolo K-RAS para a detecção de mutações

❖ **Leia atentamente estas instruções e familiarize-se com todos os componentes do Kit K-RAS antes de utilizá-lo.**

Para utilizar o Kit K-RAS eficazmente, as amostras devem estar num lote de 10 (para encher uma placa de 96 poços). A utilização de lotes mais pequenos faz com que possam ser testadas menos amostras com o Kit K-RAS.

Configuração experimental do LightCycler® 480 Instrument

Para cada amostra de ADN, os ensaios de mutação e de controlo têm de ser analisados na mesma execução de PCR, para evitar as variações de execução para execução.

1. Descongele à temperatura ambiente as misturas de reacção e o padrão misturado do Kit K-RAS. Uma vez que descongeladas, misture cada uma das soluções invertendo cada tubo 10 vezes, para evitar concentrações de sais localizadas. Prepare misturas suficientes para as amostras de ADN, o padrão misturado e os controlos sem modelo (NTC), mais 2 reacções adicionais por cada mistura, conforme indicado no Quadro 5.

Quadro 5: Volumes de mistura principal do Kit K-RAS

Ensaio	Misturas principais			
	Mistura de reacção (µl) x1	Taq (µl) x1	Mistura de reacção (µl) por placa (x14)	Taq (µl) por placa (x14)
Ensaio de controlo	19,8	0,2	277,2	2,8
Ensaio de mutação	19,8	0,2	277,2	2,8

2. NÃO misture com agitação forte a *Taq*, ou quaisquer misturas de reacção que contenham *Taq*, pois poderia causar a desactivação da enzima.
3. Certifique-se de que a *Taq* está à temperatura ambiente antes de ser utilizada. Vire o frasco para se assegurar que toda a *Taq* fica no fundo do frasco e, em seguida, pipete colocando a ponta da pipeta logo abaixo da superfície da *Taq*, a fim de minimizar o risco de revestir a ponta com um excesso de *Taq*.
4. Misture as misturas principais, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo.
5. Acrescente imediatamente aos poços de reacção 20 µl das misturas principais.
6. Acrescente imediatamente aos poços de reacção 5 µl de amostra, padrão misturado ou água (para os controlos sem modelo (NTC)). Cada amostra de ADN deve ser testada com todos os ensaios de mutação e o de controlo. O Quadro 6 apresenta a configuração da placa.

Quadro 6: Configuração da placa do Kit K-RAS

Disposição de 96 poços												
Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Controlo	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
B 12ALA	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
C 12ASP	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
D 12ARG	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
E 12CYS	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
F 12SER	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
G 12VAL	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
H 13ASP	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10

7. Vede e rode com brevidade a placa da PCR para assegurar a concentração dos reagentes no fundo dos poços.
8. Coloque imediatamente a placa no equipamento LightCycler® 480.

Configuração do LightCycler® 480 Instrument

1. Seleccione o ícone do LightCycler® 480 Instrument Software no ambiente de trabalho da estação de trabalho ligada ao equipamento. Inicie sessão no software e, a partir da página de perspectiva geral, seleccione 'New Experiment from Template'.
2. Escolha o 'K-RAS LC480II Run Template' a partir da lista de modelos de execução (para mais detalhes, consulte a secção de avaliação de amostras do LightCycler® 480 Instrument).
3. Seleccione o separador 'Sample Editor' e, em 'Step 1: Select Workflow', seleccione a caixa de verificação 'Abs Quant'. Em 'Select Filter Combinations', certifique-se de que ambos os filtros estão seleccionados (465-510 nm e 533-580 nm). Defina os nomes das amostras no Passo 2 e Passo 3. Na coluna 1, o nome da amostra deve ser Padrão misturado. Na coluna 2 o nome da amostra deve ser NTC. Nas colunas 3 a 12, devem ser introduzidos os nomes das amostras. Os nomes devem ser idênticos para todos os poços na coluna 1. O 'Quantification Sample Type' deve ser definido para 'unknown' (desconhecido). A coluna de réplicas deverá ser deixada em branco, uma vez que as réplicas não são consideradas pelo LightCycler® Adapt Software.
4. Seleccione o botão 'Experiment' e clique no botão 'Start Run' para guardar o ensaio e iniciar a ciclagem.

Análise de amostras do LightCycler® 480 Instrument

1. Ao concluir a execução do LightCycler® 480 Instrument, utilizando a janela do navegador, exporte o ensaio (ficheiro .ixc) para uma localização adequada que possa ser acedida pelo LightCycler® Adapt Software.
2. **IMPORTANTE:** O LightCycler® Adapt Software está validado para utilização num só sistema de computador que é definido como uma única unidade de controlo (estação de trabalho) fornecida pela Roche Diagnostics para utilização com um único LightCycler® 480 Instrument II. Esta validação do LightCycler® Adapt Software é actualmente apenas para a unidade de controlo que é um computador autónomo (ou seja, não faz parte de uma rede). É proibida a utilização de qualquer outro computador, uma vez que o software poderia não funcionar conforme previsto.
3. Abra o LightCycler® Adapt Software clicando no ícone do LightCycler® Adapt Software no ambiente de trabalho da estação de trabalho e preencha o campo do nome de utilizador. Este nome será introduzido como o autor do relatório.
4. Na janela principal, utilize o botão do browser para seleccionar um único ficheiro de execução do LightCycler® 480 (Para remover a selecção, o software tem de ser fechado e aberto novamente).

5. Seleccione um tipo de relatório (pdf ou csv). Se escolher csv, então será automaticamente criada uma versão pdf, adicionalmente.
6. Seleccione 'Analyse' para criar o relatório de resultados. O relatório é guardado automaticamente na pasta que contém o ficheiro de execução e é-lhe dado o mesmo nome que o ficheiro de execução.
7. O relatório será apresentado automaticamente.
8. O resultado reportável é apresentado na coluna 'Mutation Status' do quadro 'Sample Result Table'.

Interpretação do relatório do LightCycler® Adapt Software

1. O relatório do LightCycler® Adapt Software contém informações gerais sobre a análise.
 - 1.1. O autor do relatório é a pessoa que executou o software e criou o relatório.
 - 1.2. É indicada a data e hora da análise.
2. O relatório oferece uma perspectiva geral da análise, com pormenores sobre o nome do ficheiro de execução utilizado, mais o ficheiro de definição do algoritmo e a sequência do algoritmo. Os pormenores do algoritmo são fixos e não podem ser alterados.
3. A secção de resultados indica o nome completo e o caminho do ficheiro da execução do LightCycler® 480 Instrument, assim como os seguintes pormenores:
 - 3.1. Número de série do LightCycler® 480 Instrument.
 - 3.2. "Instrument Name" - o identificador atribuído ao LightCycler® 480 Instrument no LightCycler® 480 Instrument Software.
 - 3.3. "Run Date" - a data e hora da execução do LightCycler® 480 Instrument.
 - 3.4. "Run Operator" - o nome da pessoa que se encontrava em sessão no LightCycler® 480 Instrument Software quando o ensaio foi executado.
 - 3.5. "Experiment Name" - o nome do ficheiro de execução.
 - 3.6. "Software Version" - a versão do software utilizado no LightCycler® 480 Instrument.
 - 3.7. "Lot Number" - número de lote obtido do campo 'Lot No' do ecrã de configuração do ensaio no LightCycler® 480 Instrument Software.
4. A configuração da placa é apresentada com os nomes de amostras obtidos do ecrã de edição de amostras do LightCycler® 480 Instrument Software.
5. É apresentado um 'Run Summary Result' quando a execução é determinada como Válida ou Inválida. Isto é dependente dos controlos da execução nas colunas 1 e 2.

6. Controlos da execução

6.1. O LightCycler® Adapt Software calcula automaticamente o valor ΔCt do padrão misturado utilizando a fórmula:

$$Ct \text{ de mutação} - Ct \text{ de controlo} = \Delta Ct$$

6.2. O LightCycler® Adapt Software compara os valores com os valores previstos indicados no Quadro 7.

Quadro 7: Valores ΔCt previstos do LightCycler® Adapt Software

Ensaio	ΔCt do padrão misturado
12ALA	-0,61
12ASP	-0,61
12ARG	0,34
12CYS	-0,79
12SER	-0,13
12VAL	0,1
13ASP	-0,74

6.3. Os valores Ct e ΔCt são indicados.

6.4. Os seguintes Alarmes/Avisos são assinalados para os controlos de execução nas colunas 1 e 2:

Quadro 8: Alarmes/Avisos do LightCycler® Adapt Software para os controlos de execução

Alarme/Aviso	Significado
CT_OUT_OF_RANGE	O Ct do FAM para o ensaio de controlo está fora do intervalo
EXO_FAIL	Para o padrão misturado, o Ct do controlo exógeno é < 30 ou é negativo quando o resultado FAM é negativo
DELTA_CT_OUT_OF_RANGE	Os valores ΔCt de mutação estão fora do intervalo definido.
EXO_CONTROL_INVALID	A reacção do controlo exógeno falhou num NTC
TARGET_CHANNEL_INVALID	A reacção do FAM tem um valor Ct positivo num NTC

6.4.1. Os significados dos Alarmes/Avisos são descritos mais detalhadamente a seguir:

6.4.1.1. **CT_OUT_OF_RANGE** - O ensaio de controlo para o padrão misturado deve ter um valor Ct de $26,60 \pm 2$. Se o ensaio estiver fora deste intervalo, é apresentado este Alarme/Aviso para todos os poços de padrão misturado, dado que os valores ΔCt não são calculados e o padrão misturado é inválido. Isto indica que o ensaio de controlo não está a funcionar correctamente.

- 6.4.1.2. **EXO_FAIL** - Este Alarme/Aviso é apresentado se o ensaio do controlo exógeno em qualquer um dos poços de padrão misturado tiver um valor inferior a 30, pois isto poderia indicar que nesta mistura está presente contaminação da PCR. Se o ensaio do controlo exógeno falhar quando uma reacção FAM falhar em qualquer um dos poços de padrão misturado, também aparece o Alarme/Aviso EXO_FAIL. Isto indica que existe um problema com este ensaio que poderá originar resultados falso-negativos. O padrão misturado já se encontra invalidado devido à falha do FAM.
- 6.4.1.3. **DELTA_CT_OUT_OF_RANGE** - Se os valores ΔCt do padrão misturado se encontrarem dentro de $\pm 2,00$ dos valores indicados no Quadro 7, o software indicará um estado válido. Se o ΔCt estiver para além do intervalo esperado, o estado será inválido e será apresentado este Alarme/Aviso. Isto indica que existe um problema com um ensaio que poderá originar resultados falsos.
- 6.4.1.4. **EXO_CONTROL_INVALID** - Nos poços de controlo sem modelo (NTC), o ensaio de controlo exógeno tem de apresentar um resultado positivo em todos os 8 poços ($Ct < 41$). Se for obtido um resultado negativo, este Alarme/Aviso é apresentado e é indicado um estado de inválido. Isto indica um problema com o ensaio, que poderá originar resultados falsos.
- 6.4.1.5. **TARGET_CHANNEL_INVALID** - Nos 8 poços de controlo sem modelo (NTC), o resultado do FAM tem de ser negativo ($Ct > 38$). Qualquer amplificação indica contaminação. Um resultado positivo fará com que este Alarme/Aviso seja apresentado e invalidará o controlo sem modelo (NTC).
- 6.5. No caso de um estado de inválido para qualquer um dos poços de padrão misturado ou poços de controlo sem modelo (NTC), o 'Run Summary Result' será 'Run Invalid'. No quadro 'Sample Result Table', estarão indicados os nomes das amostras e os valores Ct de controlo, mas o estado de mutação estará indicado como 'invalid'. O padrão misturado indica que todos os ensaios estão a funcionar correctamente. Se não for este o caso, poderá originar um falso positivo ou uma determinação de mutação negativa falsa. O controlo sem modelo (NTC) indica que não existe contaminação nas misturas principais e que o controlo exógeno está a funcionar conforme previsto.
- 6.6. No caso improvável do LightCycler® Adapt Software gerar uma mensagem de erro, consulte a secção 12, Assistência técnica.

7. Resultados de amostras

- 7.1. O quadro 'Sample Result Table' apresenta nomes de amostras obtidos do LightCycler® 480 Instrument Software e valores Ct de ensaio de controlo.
- 7.2. O LightCycler® 480 Adapt Software calcula os valores ΔCt , e determina se uma amostra é positiva ou negativa quanto a mutação, com base nos valores de cut-off de 1% indicados no Quadro 9.

Quadro 9: Valores de cut-off de 1% do LightCycler® Adapt Software

Ensaio	Valores ΔCt de 1%
12ALA	6,25
12ASP	7,72
12ARG	6,83
12CYS	6,95
12SER	8,95
12VAL	6,5
13ASP	9,09

- 7.3. Se um valor ΔCt de mutação para uma amostra for inferior ao valor de cut-off ΔCt de 1%, a amostra é determinada como positiva de mutação. O LightCycler® Adapt Software indicará que está presente mutação mas indicará apenas uma única mutação. Se existirem 2 valores ΔCt positivos, será indicado o valor mais pequeno. É assumido que o segundo valor tenha sido gerado através de reactividade cruzada de uma iniciação e ligação de um iniciador de mutação de uma mutação diferente. Nos raros casos em que está presente uma mutação dupla, a decisão clínica será idêntica ao do caso em que está presente uma mutação simples.
- 7.4. Se os valores ΔCt da amostra forem superiores aos valores ΔCt de 1%, a amostra é considerada negativa quanto a mutação (poderá conter uma mutação mas a um nível que está abaixo dos limites deste kit).
- 7.5. Alarmes/Avisos
- 7.5.1. O LightCycler® Adapt Software gerará um número de Alarmes/Avisos para as amostras no quadro 'Sample Result Table', conforme descrito no Quadro 10.

Quadro 10: Alarmes/Avisos de amostras do LightCycler® Adapt Software

Alarma/Aviso	Significado
REP_DILUTION	O Ct de controlo é inferior a 24
CONF_LEVEL LIMITED	O Ct de controlo é superior a 28,9 e nenhuma mutação é indicada
EXO_FAIL	O ensaio de controlo exógeno falhou quando a reacção do FAM também falhou numa reacção de mutação, ou o Ct do controlo exógeno é inferior a 30.
FAIL	O software não consegue determinar se a curva é positiva ou negativa

7.5.2. Os significados dos Alarmes/Avisos são descritos mais detalhadamente a seguir:

7.5.2.1. **REP_DILUTION** - Ct de controlo < 24. O ensaio foi validado para um nível de ADN que apresenta um Ct de controlo de 24 ou superior. Se uma amostra apresentar um Ct de ensaio de controlo inferior, deverá ser diluída para assegurar que fica dentro do intervalo de trabalho válido.

7.5.2.2. **CONF_LEVEL** - Ct de controlo > 28,9. Uma amostra negativa com um Ct de controlo > 28,9 será assinalada com um Alarme/Aviso CONF_LEVEL. Os valores Ct de mutação são classificados como negativos ou para além dos limites do kit quando forem iguais ou superiores a 38. É necessário ter um Ct de controlo de 28,9 ou inferior para fornecer ADN suficiente para que uma mutação de 1% seja detectada, determinados os valores de cut-off de 1% e o valor de cut-off Ct de 38. Se o Ct de controlo for superior a 28,9 e for detectada uma mutação, é apresentada uma mutação positiva e este Alarme/Aviso não é apresentado, uma vez que esta amostra contém uma mutação clara. No entanto, se o Ct de controlo for superior a 28,9 e a amostra parecer ser de negativa quanto a mutação, este Alarme/Aviso é apresentado para avisar que mutações de nível baixo poderão ter passado despercebidas. À medida que o Ct de controlo aumenta acima de 28,9, a sensibilidade da detecção da mutação diminui.

7.5.2.3. **LIMITED** - Ct de controlo > 35. Indica que está disponível muito pouco ADN amplificável, pelo que só podem ser detectadas mutações presentes numa alta percentagem. Nas amostras LIMITED, se uma mutação positiva apresentar um Ct < 38, ser-lhe-á atribuído ainda um estado válido e será reportada. A presença de mutações de baixo nível numa amostra com um resultado negativo e um Alarme/Aviso LIMITED não pode ser descontada.

7.5.2.4. **EXO_FAIL** - O software verifica se há amplificação do ensaio de controlo exógeno para estabelecer se poderia estar presente um inibidor, que poderia originar um resultado negativo falso. É utilizada a seguinte lógica:

- a. A reacção do controlo exógeno será avaliada apenas nos poços de reacção de mutação, não no poço do ensaio de controlo, com a excepção das colunas de padrão misturado e de NTC (ver ponto 6) ou se um Ct de controlo exógeno for < 30.

- b. Se existir uma determinação de mutação positiva, mas o ensaio de controlo exógeno tiver falhado no poço positivo quanto a mutação, o Alarme/Aviso EXO_FAIL não será apresentado, uma vez que poderá existir inibição competitiva da reacção de FAM. O estado da mutação é válido.
 - c. Se existir uma determinação de mutação positiva para uma amostra num poço de mutação e um ensaio de controlo exógeno tiver falhado num poço de mutação diferente para a mesma amostra, a mutação no primeiro poço será determinada e o resultado é válido. No entanto, será apresentado um Alarme/Aviso EXO_FAIL. Este indica que existe um problema com o ensaio no poço em que o ensaio de controlo exógeno falhou, e uma mutação poderá ter passado despercebida neste poço.
É possível que a mutação determinada seja uma reactividade cruzada entre os ensaios, em vez da verdadeira mutação, que passou despercebida. No entanto, o estado da mutação no ensaio que indica a determinação da mutação positiva permanece válido, uma vez que está presente uma mutação clara e a decisão clínica permanece a mesma, independentemente da mutação que estiver presente.
 - d. Se a amostra for determinada como negativa, mas uma reacção do controlo exógeno tiver falhado em qualquer um dos ensaios de mutação, será apresentado o Alarme/Aviso EXO_FAIL e o estado é inválido. É possível que uma mutação possa ter passado despercebida.
 - e. Se o Ct do ensaio do controlo exógeno for < 30 em qualquer um dos 8 poços, será apresentado um Alarme/Aviso EXO_FAIL e o estado será inválido. É possível que exista contaminação de produto da PCR neste ensaio.
 - f. O ficheiro de execução do LightCycler® 480 Instrument pode ser verificado para estabelecer a causa possível do ensaio de controlo exógeno falhar. Se todas as reacções do controlo exógeno tiverem falhado numa coluna, poderá estar presente um inibidor. Se tiver falhado em apenas 1 poço, poderá existir um problema de configuração da placa.
- 7.5.2.5. **FAIL** - É apresentado um Alarme/Aviso FAIL quando o software não consegue determinar uma curva de amplificação como positiva ou negativa, por exemplo, se o formato da curva for anormal.

7.5.3. O LightCycler® Adapt Software verifica se o nome de amostra numa coluna inteira é o mesmo, de maneira a assegurar de que a mutação e os valores Ct do ensaio de controlo utilizados para calcular os valores ΔCt são da mesma amostra. Os nomes de amostras são obtidos do ecrã de edição de amostras do LightCycler® 480 Instrument no ficheiro de execução do ensaio. Se houver um conflito de nomes na coluna, o software indica SAMPLE MISMATCH na coluna Sample Name do quadro Sample Result Table. Na disposição da placa, o software indica o nome da amostra, seguido por (MISMATCH). Se se tratar de um erro ortográfico, o nome pode ser corrigido no ficheiro de execução do LightCycler® 480 Instrument, e os dados novamente analisados com o LightCycler® Adapt Software.

Configuração experimental do ABI7500

Para cada amostra de ADN, os ensaios de mutação e de controlo têm de ser analisados na mesma execução de PCR, para evitar as variações de execução para execução.

1. Descongele à temperatura ambiente as misturas de reacção e o padrão misturado do Kit K-RAS. Uma vez que descongeladas, misture cada uma das soluções invertendo cada tubo 10 vezes, para evitar concentrações localizadas de sais. Prepare misturas suficientes para as amostras de ADN, o padrão misturado e os controlos sem modelo (NTC), mais 2 reacções adicionais por cada mistura, conforme indicado no Quadro 11.

Quadro 11: Volumes de mistura principal do Kit K-RAS

Ensaio	Misturas principais			
	Mistura de reacção (μl) x1	<i>Taq</i> (μl) x1	Mistura de reacção (μl) por placa (x14)	<i>Taq</i> (μl) por placa (x14)
Ensaio de controlo	19,8	0,2	277,2	2,8
Ensaio de mutação	19,8	0,2	277,2	2,8

2. NÃO misture com agitação forte a *Taq*, ou quaisquer misturas de reacção que contenham *Taq*, pois poderia causar a desactivação da enzima.
3. Certifique-se de que a *Taq* está à temperatura ambiente antes de ser utilizada. Vire o frasco para se assegurar que toda a *Taq* fica no fundo do frasco e, em seguida, pipete colocando a ponta da pipeta logo abaixo da superfície da *Taq*, a fim de minimizar o risco de revestir a ponta com um excesso de *Taq*.

4. Misture as misturas principais, pipetando cuidadosamente para cima e para baixo.
5. Acrescente imediatamente aos poços de reacção 20 µl das misturas principais.
6. Acrescente imediatamente aos poços de reacção 5 µl de amostra, padrão misturado ou água (para os controlos sem modelo (NTC)). Cada amostra de ADN deve ser testada com os ensaios de controlo e de mutação. O Quadro 12 apresenta a configuração da placa.

Quadro 12: Configuração da placa K-RAS do ABI7500

Disposição de 96 poços												
Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Controlo	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
B 12ALA	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
C 12ASP	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
D 12ARG	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
E 12CYS	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
F 12SER	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
G 12VAL	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
H 13ASP	Padrão misturado	NTC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10

7. Vede e rode com brevidade a placa da PCR para assegurar a concentração dos reagentes no fundo dos poços.
8. Coloque imediatamente a placa no equipamento ABI7500.

Configuração do Equipamento ABI7500

1. Selecione o ícone do 7500 System Software no ambiente de trabalho da estação de trabalho ligada ao equipamento. Abra um novo ficheiro de execução a partir do menu File, utilizando o 7500 Sequence Detection Software versão 1.4.
2. Em 'Assay', seleccione 'Standard Curve (Absolute Quantification)'. Em 'Run Mode', seleccione 'Standard 7500'.
3. Desloque-se para a janela de configuração do detector, seleccionando o botão 'Next'. Adicione à lista de detectores um detector JOE e um FAM, com os supressores definidos para 'none'.

Se estes detectores ainda não existirem, seleccione o botão 'New Detectors' e defina um detector FAM e um JOE com o supressor definido para 'none'.

4. Defina 'Passive Reference' para 'None' e seleccione o botão 'Next'.
5. Seleccione a placa inteira e marque as caixas de verificação para os detectores FAM e JOE, para garantir que ambos os corantes são monitorizados em cada um dos poços. Seleccione o botão 'Finish'.
6. No separador 'Instrument', defina a ciclagem conforme indicado no Quadro 13.

Quadro 13: Condições de ciclagem do ABI7500

Temperatura	Tempo	Ciclos	Recolha de dados
Fase 1			
95°C	4 min.	1	
Fase 2			
95°C	30 seg.		
60°C	1 min.	40	FAM, JOE

7. Seleccione o botão 'Start' para guardar o ensaio e iniciar a ciclagem.

Análise de amostras do ABI7500

1. Certifique-se de que a referência passiva está definida para 'none' no ecrã de inspector de poços.
2. Verifique se cada um dos poços emite um sinal JOE do ensaio de controlo exógeno.
 - a. Se o ensaio de controlo exógeno produzir um resultado positivo, continue com a análise.
 - b. Se o ensaio de controlo exógeno tiver falhado mas a reacção do FAM tiver amplificado fortemente, continue com a análise pois a reacção do FAM predominou sobre a reacção de controlo exógeno.
 - c. Se ambas as reacções, do FAM e da reacção de controlo exógeno, tiverem falhado, os dados devem ser eliminados pois poderão estar presentes inibidores. Esses inibidores poderiam originar resultados falso-negativos.
3. No separador Amplification Plot, seleccione todos os poços em utilização e seleccione o corante FAM a partir do menu de lista pendente de detectores. Utilize a definição da linha de base automática e o Ct manual e, em seguida, defina manualmente o limiar no meio da fase exponencial, utilizando a escala logarítmica para o eixo Y, conforme descrito no guia do utilizador do ABI7500.
4. Analise os dados e calcule o valor ΔCt da seguinte maneira:

$$[Ct \text{ do ensaio de mutação da amostra}] - [Ct \text{ do ensaio de controlo da amostra}] = \Delta Ct$$

Para facilidade de análise, os dados podem ser exportados para o Microsoft Excel.

Interpretação dos dados do ABI7500

1. Valores Ct de controlo:
 - 1.1. O valor do Ct de controlo deve ser ≥ 24 , para evitar sobrecarregar o ensaio.
 - 1.2. Ct de controlo < 29 : o Kit K-RAS consegue detectar nestas amostras mutações muito pequenas, como as de apenas 1%.
 - 1.3. Em amostras com um Ct de controlo de ≥ 29 , o kit não detecta mutações muito pequenas, como as de 1%, mas continua a conseguir detectar mutações de níveis mais elevados.
 - 1.4. Ct de controlo ≥ 35 . Apenas algumas cópias amplificáveis de ADN estão presentes na amostra, e só será provável visualizar mutações se a maioria das cópias tiver sofrido mutação.
 - 1.5. Ct de controlo ≥ 38 , o ADN é reduzido e os dados não deverão ser utilizados.
2. Valores Δ Ct do padrão misturado
 - 2.1. Os valores Δ Ct do padrão misturado devem ser os valores indicados no Quadro 14, embora possam ocorrer variações de ± 2 devido a diferentes definições de limiar em diferentes equipamentos.

Quadro 14: Valores Δ Ct do padrão misturado e pontos de cut-off de 1% do ABI7500

Ensaio	Δ Ct do padrão misturado	Intervalo aceitável do padrão misturado	Δ Ct 1% da amostra
12ALA	-0,70	-2,70 a 1,30	6,5
12ASP	-1,04	-3,04 a 0,96	8
12ARG	-0,02	-2,02 a 1,98	8
12CYS	-0,98	-2,98 a 1,02	7
12SER	0,02	-1,98 a 2,02	9
12VAL	-0,19	-2,19 a 1,81	6,5
13ASP	-1,12	-3,12 a 0,88	9

3. Valores Δ Ct da amostra:
 - 3.1. Se o valor Δ Ct da amostra for superior ao valor de 1% (conforme indicado no Quadro 14), a amostra de ADN é classificada como negativa quanto a mutação ou estando abaixo dos limites do Kit K-RAS.
 - 3.2. Se o Δ Ct da amostra for inferior ao valor de 1%, a amostra de ADN é classificada como positiva quanto a mutação.
 - 3.3. Os valores Ct de mutação de 38 ou superior devem ser classificados como negativos ou abaixo dos limites do kit.

10. Limitações do teste

Para detectar a mutação de 1% num fundo de ADN de tipo selvagem, é necessário ter um Ct do ensaio de controlo da amostra < 29 no ABI7500 e de < 28,9 no LightCycler® 480 Instrument. Os ensaios não conseguirão detectar mutação a 1% em amostras com valores Ct de controlo superiores e a sensibilidade da detecção de mutação diminuirá à medida que o Ct de controlo aumentar acima destes valores.

O valor do Ct de controlo do ADN da amostra baseia-se na concentração, conforme determinado por PCR. Os valores baseados em leituras de Densidade Óptica não correspondem aos valores Ct de ensaio de controlo em amostras de ADN fragmentado. O kit inclui quantidades adicionais da mistura da reacção de controlo, para permitir a avaliação dos Cts das amostras antes de se utilizar o kit.

Se uma amostra apresentar um resultado positivo quanto a mutação em que o Ct de mutação é ≥ 38 , o ensaio deve ser classificado como negativo ou abaixo dos limites do kit. Isto é efectuado automaticamente pelo LightCycler® Adapt Software

Poderá ocorrer alguma reactividade cruzada entre as reacções de mutação. Por exemplo, se ocorrer um nível elevado de mutação 12ALA, algumas das outras reacções de mutação também apresentarão resultados positivos. Isto deve-se ao facto dos iniciadores ARMS detectarem outras mutações no âmbito de algumas bases umas das outras. No material de controlo sintético, a reactividade cruzada forma um padrão legível no ABI7500, que permite que o verdadeiro positivo seja determinado a partir de vários sinais (ver Quadro 15).

Quadro 15: Padrão de reactividade cruzada do material de controlo sintético no ABI7500

Sim indica o sinal verdadeiro. Os números indicam o número aproximado de ciclos, a seguir ao sinal verdadeiro, durante os quais se pode verificar um sinal de reactividade cruzada. Não se introduziram valores para além de 9 ciclos, dado que os mesmos ficariam na zona negativa.

Amostra positiva	Sinal 12ALA	Sinal 12ASP	Sinal 12ARG	Sinal 12CYS	Sinal 12SER	Sinal 12VAL	Sinal 13ASP
12ALA	Sim	9	-	6	3	6	-
12ASP	9	Sim	-	-	-	-	-
12ARG	-	-	Sim	-	-	-	-
12CYS	-	7	4	Sim	-	-	-
12SER	9	6	9	-	Sim	-	8
12VAL	4	-	-	-	-	Sim	-
13ASP	-	-	-	-	-	-	Sim

Nota: O padrão de reactividade cruzada poderá ser diferente em amostras de ADN, por ex., amostras de ADN envolvidas em parafina.

O Kit K-RAS foi concebido para detectar uma mutação numa amostra de ADN. Caso um segundo ensaio de mutação produzir um resultado positivo, é provável que se trate de reactividade cruzada. No entanto, já se observaram mutantes duplos, embora raramente. Se o padrão não se enquadrar no padrão de reactividade cruzada, poderá ser necessário fazer mais investigações.

11. Características de desempenho dos ensaios

O desempenho de ensaio foi caracterizado para o Kit K-RAS Kit no ABI7500 e no LightCycler® 480 Instrument (utilizando o LightCycler® Adapt Software para obter valores Ct). Foram realizados vários testes em cada um dos equipamentos. Os resultados desses testes são resumidos a seguir.

Validação do cut-off de 1%:

LightCycler® 480 Instrument: A detecção da mutação de 1% num plano de fundo do ADN da linha celular negativa à mutação do Kit K-RAS, foi determinada através de uma série de três diferentes concentrações do ADN da linha celular, para atribuir um valor Δ Ct de cut-off a cada ensaio de mutação.

Para cada ensaio, foram testadas diluições de 1% em triplicado, em 3 execuções separadas, tanto para o ensaio de controlo como para o ensaio de mutação. Este procedimento foi repetido por 3 diferentes operadores. Os valores Ct foram obtidos a partir do LightCycler® Adapt Software.

Calcularam-se os valores Δ Ct de 1% a partir de todas as combinações de mutação e os valores Ct de controlo relativos às réplicas numa execução.

Os valores Δ Ct de cut-off foram definidos como o valor médio de todas as execuções e concentrações. Os resultados destes testes encontram-se resumidos na secção de interpretação de dados.

ABI7500: Para cada ensaio, foram testadas diluições de 1% em triplicado, para 3 lotes do kit, em 3 execuções separadas, tanto para o ensaio de controlo como para o ensaio de mutação. O padrão misturado foi utilizado em cada placa, para assegurar que os ensaios estavam a funcionar dentro dos critérios especificados.

Calcularam-se os valores Δ Ct de 1% a partir de valores Ct médios relativos às réplicas numa execução e um lote. Os valores Δ Ct de cut-off foram definidos como o valor médio (arredondado para o 0,5 mais próximo) de todos os lotes, execuções e concentrações, para concentrações em que todas as réplicas deram um valor Ct. Os resultados destes testes encontram-se resumidos no Quadro 16 a seguir.

Quadro 16: Resultados da validação dos valores de cut-off de 1% do ABI7500

Ensaio	Média	Valores Δ Ct de 1%
12ALA	6,68	6,5
12ASP	8,2	8
12ARG	8,16	8
12CYS	6,94	7
12SER	8,83	9
12VAL	7,67	7,5*
13ASP	8,89	9

* O cut-off de 1% do 12VAL foi alterado para 6,5, com base no estudo de Sobressaturação. Consulte a argumentação descrita a seguir.

Determinação do Δ Ct do padrão misturado:

LightCycler® 480 Instrument: Os valores Δ Ct do padrão misturado são valores médios obtidos de 50 execuções nas quais o padrão misturado foi testado. Os valores Ct foram obtidos a partir do LightCycler® 480 Adapt Software.

Os valores Δ Ct previstos para o padrão misturado estão apresentados na secção de interpretação de dados.

ABI7500: Os valores do padrão misturado foram definidos utilizando a média de 422 valores Δ Ct. Estes foram calculados através de muitos diferentes lotes de kit e execuções.

Os valores Δ Ct previstos para o padrão misturado estão apresentados na secção de interpretação de dados.

Validação da sobressaturação: Define-se a sobressaturação como sendo a amplificação não específica nos ensaios de mutação de um alvo de ADN de tipo selvagem presente numa amostra específica. Esta causa um nível mensurável de ruído de fundo. A sobressaturação do ADN de tipo selvagem foi avaliada em cada ensaio de mutação. O estudo de sobressaturação assegurou que os valores de cut-off de 1% estabelecidos anteriormente estavam abaixo do nível de sobressaturação e impediriam o registo de um resultado falso-positivo.

LightCycler® 480 Instrument: Dez amostras de ADN da linha celular negativas à mutação do Kit K-RAS a diferentes concentrações, 5 amostras de FFPE negativas à mutação do Kit K-RAS e 5 amostras de FFPE positivas à mutação do Kit K-RAS foram testadas em duplicado em 5 placas. As amostras positivas à mutação foram positivas para uma única mutação e as outras mutações foram utilizadas para testar a sobressaturação. Os valores Ct foram obtidos a partir do LightCycler® Adapt Software e todas as combinações de valores Ct foram utilizadas para calcular valores Δ Ct.

Os resultados dos ensaios negativos à mutação das amostras de ADN de linha celular e das amostras de FFPE apresentaram valores ΔCt que estavam todos acima dos valores de cut-off de 1%, indicando que os valores de cut-off de 1% eram robustos. O Quadro 17 apresenta os piores níveis de sobressaturação das 5 execuções.

Quadro 17: Resultados de sobressaturação

Ensaio	Piores valores ΔCt de sobressaturação
12ALA	12,35
12ASP	11,36
12ARG	Sem sobressaturação
12CYS	Sem sobressaturação
12SER	11,74
12VAL	12,29
13ASP	11,29

ABI 7500: A sobressaturação foi avaliada utilizando ADN de linha celular em pool de linhas celulares negativas à mutação do Kit K-RAS a 3 diferentes níveis de ADN. Foram testadas três placas de PCR idênticas. Cada placa incluía 3 lotes de reagentes. O padrão misturado foi utilizado como o controlo positivo. Adicionalmente, foram testadas amostras de FFPE positivas em duplicado. A maioria das amostras positivas à mutação são positivas para uma única mutação. Os outros ensaios de mutação podem ser utilizados para avaliar a sobressaturação (embora esteja prevista alguma reactividade cruzada entre alguns ensaios e mutações positivas. Contudo, isto produz um padrão conhecido). Foram obtidos valores Ct e valores ΔCt e comparados aos valores de cut-off de 1%.

Os dados das amostras de ADN de linha celular e das amostras de FFPE apresentaram valores ΔCt que estavam todos acima dos valores de cut-off de 1%, excepto de uma amostra de FFPE que apresentou um ΔCt mesmo abaixo (6,84) do cut-off de 7,5. Como o intervalo de dados da determinação de cut-off de 1% cobria 6,84, o valor ΔCt de 1% para o ensaio 12VAL foi alterado de 7,5 para 6,5, para evitar a possibilidade de um resultado falso positivo. O quadro 18 a seguir apresenta os valores ΔCt de 1% actuais, com base nos resultados de validação de sobressaturação.

Quadro 18: Resultados da validação de sobressaturação

Ensaio	Valores ΔCt de 1%
12ALA	6,5
12ASP	8
12ARG	8
12CYS	7
12SER	9
12VAL	6,5
13ASP	9

Validação da precisão:

LightCycler® 480 Instrument: A precisão foi testada utilizando controlos sintéticos de 1% em 3 níveis diferentes de ADN da linha celular negativas à mutação do Kit K-RAS. Cada controlo foi testado em triplicado para o ensaio relevante numa placa que também continha padrão misturado em duplicado e reacções NTC simples para assegurar que as reacções estavam a funcionar dentro das especificações. A mesma placa foi repetida 54 vezes num espaço de tempo de 6 dias. Incorporada nesta matriz de execuções estava a utilização de 3 equipamentos, 3 lotes de reagentes e 3 operadores.

Os valores Ct foram obtidos a partir do LightCycler® Adapt Software e todas as combinações de valores Ct foram utilizadas para calcular valores Δ Ct. Todos os valores Δ Ct que excediam três vezes a distância interquartilica foram considerados atípicos e removidos da análise. Foram calculadas médias, erros padrão e desvios padrão, e os dados foram agrupados por lote de kit, equipamento ou operador, para avaliar a variação causada por estas variáveis. A repetitividade geral dos ensaios também foi avaliada.

Os dados indicam que a variação geral entre os ensaios é baixa e 2 desvios padrão à volta da média cobrem um intervalo de $\pm 1,4$ ciclos da média para o ensaio com o desvio padrão máximo.

Para todos os testes, o Δ Ct médio para cada operador encontra-se dentro dos 0,15 ciclos da média geral para todo o conjunto de dados. As diferenças entre operadores não eram superiores a 0,2 Ct, demonstrando que a variação entre operadores não era superior à variação entre todo o conjunto de dados e que os ensaios eram suficientemente robustos para suportar a variação entre operadores.

Para cada um de todos os testes, a diferença entre as médias dos equipamentos individuais e a média geral era de $\pm 0,097$ e a diferença entre as médias dos equipamentos individuais não era pior do que $\pm 0,186$, demonstrando que a variação entre equipamentos não era superior à variação entre todo o conjunto de dados e que os ensaios eram suficientemente robustos para suportar a variação entre equipamentos.

Para cada um de todos os testes, a diferença entre um só lote e a média geral era de $\pm 0,195$ e a pior diferença entre lotes era de $\pm 0,38$, demonstrando que a variação entre lotes não era superior à variação entre todo o conjunto de dados e que os ensaios eram suficientemente robustos para suportar a variação entre lotes.

ABI7500: Foram efectuadas experiências para estabelecer o desempenho de precisão de cada ensaio, através da repetição de uma placa de PCR, com uma gama de amostras com concentrações de ADN altas e baixas e nível de mutação alto e baixo, para 3 lotes de reagentes num dia, entre dias, entre operadores e entre equipamentos.

Foi utilizado um ANOVA de uma via para avaliar a variação entre réplicas, lotes de reagente, execuções, dias de testes, equipamentos e operadores. A hipótese nula era de que os valores médios eram iguais em todas as categorias. As médias totais, DP e %CV foram também calculados para os valores Ct.

Nenhum dos ensaios apresentou um desvio significativo, ao nível de $p=0,05$, da hipótese nula das médias sendo iguais em todas as categorias. Isto indica que os ensaios eram suficientemente robustos para suportar as variações de equipamento para equipamento, operador para operador, lote para lote, dia para dia e execução para execução.

Validação da precisão:

LightCycler® 480 Instrument: A precisão foi avaliada utilizando 92 amostras de FFPE e 28 diluições de linha celular positiva à mutação. Estas foram testadas com o Kit K-RAS e também foram sequenciadas utilizando o sequenciamento Sanger. As determinações de mutação do Kit K-RAS foram comparadas entre os 2 métodos e obtiveram-se 18 resultados discrepantes (5 FFPEs e 13 linhas celulares), em que o sequenciamento indicava um resultado negativo, mas a amostra era positiva utilizando o ensaio DxS. Para confirmar a presença de uma mutação nestas 18 amostras, cada uma teve a região à volta das mutações clonada. Para resolver a discrepância, foi utilizada a presença de um clone positivo quanto a mutação.

ABI 7500: A precisão foi avaliada utilizando controlos sintéticos diluídos em 2 níveis de ADN da linha celular negativos à mutação do Kit K-RAS para obter 3 diferentes percentagens de mutação, cobrindo ambos os níveis de mutação, positivo e negativo. Para cada mutação, foram executadas 3 placas idênticas, utilizando cada uma 3 lotes de reagente. Foram testados níveis de mutação de 25%, 5% e 0,5%. (As amostras de 25% e 5% deverão originar resultados positivos quanto a mutação (ΔCt abaixo dos valores de cut-off de 1%); a amostra de 0,5% deverá originar um resultado negativo quanto a mutação (ΔCt acima dos valores de cut-off de 1%)). Os resultados encontram-se resumidos no Quadro 19 a seguir.

Quadro 19: ABI7500 Resultados da validação da precisão

Ensaio	25%	5%	0,5%
Ensaio	100%	100%	94%
12ALA	100%	100%	100%
12ASP	100%	100%	100%
12ARG	100%	100%	100%
12CYS	100%	100%	100%
12SER	100%	100%	100%
12VAL	100%	100%	100%
13ASP	100%	100%	100%

A redução em precisão do ensaio 12ALA deve-se à variação entre réplicas a um nível de ADN.

Validação da linearidade:

LightCycler® 480 Instrument: A linearidade foi avaliada utilizando padrões sintéticos a níveis de mutação de 100%, 1% e 0% para cada ensaio. A cada uma das percentagens de mutação, foi realizada uma diluição em série para manter o nível de mutação mas reduzir a quantidade total de ADN. Produziram-se curvas padrão, executando cada diluição em triplicado em 3 placas de réplicas para o ensaio de controlo e o ensaio de mutação relevante. Os valores Ct foram produzidos utilizando o LightCycler® Adapt Software. Foi produzido um gráfico para cada mutação (dados não indicados), em que o Ct do ensaio de controlo e o Ct do ensaio de mutação foram representados graficamente um em relação ao outro e foi efectuada uma regressão para cada nível de mutação. Os intervalos de confiança de 95% também foram representados graficamente para cada nível de mutação.

Não se obtiveram valores Ct de mutação dos testes de 0%. Os gráficos de 100% e 1% mostraram que havia uma discriminação clara entre os conjuntos de dados, e os declives das curvas eram substancialmente equivalentes, indicando uma eficácia de amplificação semelhante em toda uma gama de concentrações de mutação.

ABI7500: Este estudo avaliou a eficácia de cada um dos ensaios de mutação em toda uma gama de concentrações de ADN, num fundo de ADN de tipo selvagem e em água. Cada ensaio de mutação deverá apresentar uma eficácia de 90 a 110% (100% \pm 10%).

Para cada ensaio, foram definidas curvas padrão utilizando uma diluição em série de 5 vezes, e foi executada uma placa de PCR contendo três lotes de reagentes do kit. Os padrões de mutação de 100% foram testados a 50 ng, 10 ng, 2 ng e 0,4 ng de ADN em cada um dos ensaios de mutação, diluindo em água. Os ensaios de mutação também foram testados utilizando uma diluição em série de 5 vezes em 10 ng/ μ l de ADN de linha celular, para avaliar o efeito de sobressaturação.

Foram geradas curvas padrão para cada ensaio de mutação, a partir dos dados experimentais. As eficácias da PCR foram calculadas utilizando a equação:

$$100((10^{-1/\text{Declive}})-1)$$

O nível mais alto de sobressaturação nas diluições de linha celular de 10 ng/ μ l originou eficácias superiores a 100%.

Foram calculadas as eficácias gerais em todos os lotes de reagentes. Todos os valores foram semelhantes e dentro de 10% da eficácia do ensaio de controlo. Curvas padrão paralelas entre o ensaio de controlo e os ensaios de mutação, significa que o método de Δ Ct de análise é adequado para utilização.

Manteve-se a linearidade a níveis aceitáveis ao longo do intervalo de 0,4 ng de ADN a 50 ng de ADN.

Validação da reactividade cruzada:

LightCycler® 480 Instrument: A validação da reactividade cruzada não foi realizada, uma vez que o LightCycler® Adapt Software apenas assinala uma única mutação com o ΔCt mais pequeno.

ABI7500: Uma vez que toda as mutações detectadas pelo Kit K-RAS ocorrem com uma região de 5 pares da base, é de esperar a ocorrência de alguma reactividade cruzada entre os iniciadores. Este estudo determinou o padrão de reactividade cruzada do Kit K-RAS.

Efectuaram-se testes utilizando controlos de mutação sintéticos para estabelecer quantos ciclos depois de um positivo verdadeiro é possível detectar um sinal de reactividade cruzada. Cada mistura de reacção de mutação foi executada com seis réplicas dos sete controlos individuais de mutação de 100%. Além disso, cada controlo foi testado com a mistura de reacção correspondente e com todas as outras misturas de reacção na mesma execução.

O padrão de reactividade cruzada foi determinado calculando a diferença entre o valor Ct da amplificação real da cassette correspondente e o sinal de reactividade cruzada de cada um dos outros iniciadores.

O padrão de reactividade cruzada previsto é apresentado no Quadro 20 a seguir. O padrão de reactividade cruzada demonstrou ser consistente e permitirá que o utilizador leia um padrão de amplificação, em que mais do que um ensaio origina um resultado positivo, de forma a obter o resultado de ensaio correcto. Os números em cada célula indicam o número aproximado de ciclos após ser detectado o verdadeiro sinal positivo, para poder ser visto um sinal de reactividade cruzada. Os valores acima de 9 ciclos não foram incluídos pois classificam-se como resultados negativos quanto a mutação.

Quadro 20: ABI7500: Resultados da validação da reactividade cruzada

Amostra positiva	Sinal 12ALA	Sinal 12ASP	Sinal 12ARG	Sinal 12CYS	Sinal 12SER	Sinal 12VAL	Sinal 13ASP
12ALA	Sim	9	-	6	3	6	-
12ASP	9	Sim	-	-	-	-	-
12ARG	-	-	Sim	-	-	-	-
12CYS	-	7	4	Sim	-	-	-
12SER	9	6	9	-	Sim	-	8
12VAL	4	-	-	-	-	Sim	-
13ASP	-	-	-	-	-	-	Sim

LightCycler® 480 Instrument: Estes estudos determinaram a tolerância dos ensaios de mutação a variações de temperatura nos ciclos. Como a temperatura de "annealing" é a temperatura mais crítica que afecta o desempenho do ensaio, a temperatura de "annealing" é o parâmetro que foi variado.

A tolerância para os ciclos foi avaliada utilizando padrões sintéticos de 1% em 3 níveis diferentes de ADN. Para cada mutação estas amostras foram executadas em triplicado juntamente com o padrão misturado em duplicado e reacções NTC simples, para assegurar que os ensaios eram executados de acordo com as especificações.

Cada placa foi testada às temperaturas de "annealing" de 59°C, 60°C e 61°C. 60°C é a temperatura ideal para o ensaio ser executado, mas a variação através ou entre os blocos da PCR significa que o ensaio tem de ser robusto através de todo o intervalo especificado. Cada placa foi executada em triplicado a cada uma das temperaturas. Os valores Ct foram obtidos a partir do LightCycler® Adapt Software e todas as combinações de valores Ct de controlo e de mutação foram utilizadas para calcular os valores ΔCt .

Todos os ensaios estavam em conformidade com os critérios de aceitação de que os valores a 59°C e a 61°C não devem diferir do valor médio a 60°C \pm o desvio padrão a 60°C. Isto indica que os ensaios são suficientemente robustos para suportar um desvio de 1°C na temperatura de "annealing".

ABI7500: Foram executadas três placas de PCR idênticas, cada uma contendo 3 lotes de reagente do kit, a cada uma das temperaturas de "annealing". O padrão misturado foi testado, assim como 50 ng de ADN da linha celular em pool negativo quanto a mutação. Uma vez que 60°C é a temperatura de "annealing" recomendada, as placas foram executadas a 58°C, 60°C e 62°C. Se os ensaios fossem suficientemente robustos para tolerar as temperaturas da experiência, os valores de ΔCt do padrão misturado deveriam ficar dentro de $\pm 1,5$ dos valores definidos para o padrão misturado, e os valores ΔCt da linha celular em pool deveriam ficar acima dos pontos de cut-off de 1%.

O 12ASP mostrou a maior susceptibilidade à variação de temperatura; no entanto, todos os ensaios apresentaram resultados aceitáveis às 3 temperaturas, demonstrando que os ensaios são robustos quando executados a temperaturas 2°C acima ou abaixo da temperatura ideal.

Validação da tolerância à Taq:

LightCycler® 480 Instrument: Estes estudos determinaram a tolerância dos ensaios de mutação a variações do nível de polimerase *Taq*, uma fonte potencial de variação introduzida pelo utilizador, visto que este elemento é adicionado pelo utilizador. Foi avaliada a tolerância dos ensaios a diferentes níveis de *Taq*, utilizando padrões sintéticos de 1% em 3 níveis diferentes de ADN.

Cada amostra foi testada em triplicado, para um nível de *Taq* alto, normal e baixo (o nível alto tem 20% mais *Taq* que o normal e o nível baixo tem 20% menos *Taq* que o normal). Também foram executados padrão misturado em duplicado e reacções NTC simples, para assegurar que os ensaios estavam a funcionar dentro das especificações. Foram realizadas execuções em triplicado para cada placa, e foram testados 3 lotes diferentes de *Taq*.

Os valores Ct foram obtidos a partir do LightCycler® Adapt Software e todas as combinações de valores Ct das réplicas numa placa foram utilizadas para calcular valores ΔCt .

Todos os ensaios estavam em conformidade com os critérios de aceitação de que as médias das amostras de *Taq* alto e de *Taq* baixo não diferem do valor médio do nível normal de *Taq* por mais de 1 desvio padrão dos dados de *Taq* normal.



ABI7500: Para cada ensaio de mutação, foram executadas três placas de PCR idênticas, cada uma contendo 3 lotes de reagente do kit, variando a polimerase *Taq* em +10% e -10% da quantidade recomendada; a quantidade recomendada também foi testada. O padrão misturado foi testado, assim como os padrões de 1% em dois níveis de ADN e em 50 ng de ADN da linha celular negativo quanto a mutação. Os dados dos ensaios foram analisados para determinação da sua média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Os resultados mostraram poucas variações (DP equivalente entre os ensaios e %CV < 10%) nos resultados dos ensaios quando se variou o nível de *Taq* em $\pm 10\%$, demonstrando que os ensaios podiam tolerar uma variação de até 10% nos níveis de polimerase *Taq*.

12. Assistência técnica

Para obter assistência técnica e informações adicionais, contacte o seu distribuidor local da Roche. A secção 13 contém uma lista de pormenores de contacto dos principais distribuidores da Roche.

13. Informações sobre o fabricante e os distribuidores

	DxS Limited 48 Grafton Street, Manchester M13 9XX, Reino Unido		
 Distributed by	Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA Um Membro do Grupo Roche		
REINO UNIDO	Roche Diagnostics Charles Avenue Burgess Hill, West Sussex, Reino Unido RH15 9RY	ALEMANHA	Roche Diagnostics GmbH Sandhoferstr. 116 Dept. VM-G Mannheim, D-68298,
FRANÇA	Roche Diagnostics S.A. 2 Avenue du Vercors BP 59, Meylan Cedex, 38240	SUIÇA	Roche Diagnostics (Schweiz) AG Industriestr. 7 Rotkreuz, CH-6343
ESPANHA	Roche Diagnostics S.L. Av. de la Generalitat, s/n Sant Cugat del Valles Barcelona, E-08190	ITÁLIA	Roche Diagnostics – Italy V. le G.B. Stucchi 110 Monza (MI), I-20052

Se tiver adquirido este kit num país que não está incluído na lista de filiais da Roche Diagnostics acima, contacte a Roche Diagnostics GmbH, em Mannheim, no endereço indicado a seguir.

CENTRO PRINCIPAL DE DISTRIBUIÇÃO	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 D-68305 Mannheim
-----------------------------------------	---------------------------------------------------------------------

14. Data de emissão da última revisão

Data da última versão: Janeiro de 2009

Resumo das alterações: Redigido novamente exaustivamente para incorporar informações para utilização no Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Instrument II).

15. Referências

1. R.A. Hilger, M.E. Scheulen, D. Strumberg. (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK Pathway in the Treatment of Cancer. *Onkologie* 25: 511-518.
2. Pavan Bachireddy, Pavan K. Bendapudi, Dean W. Felsher. (2005). Getting at MYC through RAS. *Clin Cancer Res* 11(12):4278-4281.
3. Sae-Won Han, Tae-You Kim, Yoon Kyung Jeon, Pil Gyu Hwang, Seock-Ah Im, Kyung-Hun Lee, Jee Hyun Kim, Dong-Wan Kim, Dae Seog Heo, Noe Kyeong Kim, Doo Hyun Chung, Yung-Jue Bang. (2006). Optimization of Patient Selection for Gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer by combined analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation, K-ras Mutation, and AKT Phosphorylation. *Clin Cancer Res* 12(8):2538-2544.
4. William Pao, Theresa Y. Wang, Gregory J. Riely, Vincent A. Miller, Qiulu Pan, Marc Ladanyi, Maureen SF. Zakowski, Robert T. Heelan, Mark G. Kris, Harold E. Varmus. (2005). KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *PLoS Medicine* 2(1):57-61.
5. Astrid Lievre, Jean-Baptiste Bachet, Delphine Le Corre, Valerie Boige, Bruno Landi, Jean-Francois Cote, Gorana Tomasic, Christophe Penna, Michel Ducreux, Philippe Rougier, Frederique Penault-Llorca, Pierre Laurent-Puig. (2006). KRAS Mutation Status is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 66 (8): 3992-3995.
6. Silvia Benvenuti, Andrea Sartore-Bianchi, Federica Di Nicolantonio, Carlo Zanon, Mauro Moroni, Silvio Veronese, Salvatore Siena, Alberto Bardelli. (2007). *Cancer Res* 67 (6): 2643-2648.
7. W. De Roock, J. De Schutter, G. De Hertogh, M. Janssens, B. Biesmans, N. Personeni, K. Geboes, C. Verslyp, E. Van Cutsem, S. Tejpar. (2007). *Journal of Clinical Oncology* 25 (18S): 4132.
8. G. Finocchiaro, F. Cappuzzo, P.A. Janne, K. Bencardino, C. Carnaghi, W.A. Franklin, M. Roncalli, L. Crino, A. Santoro, M. Varella-Garcia. (2007). *Journal of Clinical Oncology* 25 (18S): 4021.
9. F. Di Fiore, F. Blanchard, F. Charbonnier, F. Le Pessot, A. Lamy, M.P. Galais, L. Bastit, A. Killian, R. Sesboue, J.J. Tuech, A.M. Queuniet, B. Paillot, J.C. Sabourin, F. Michot, P. Michel, T. Frebourg (2007). *British Journal of Cancer* 96: 1166-1169.
10. Shirin Khambata-Ford, Christopher R. Garrett, Neal J. Meropol, Mark Basik, Christopher T. Harbison, Shujian Wu, Tai W. Wong, Xin Huang, Chris H. Takimoto, Andrew K. Godwin, Benjamin R. Tan, Smitha S. Krishnamurthi, Howard A. Burris III, Elizabeth A. Poplin, Manuel Hidalgo, Jose Baselga, Edwin A. Clark, David J. Mauro. (2007). *Journal of Clinical Oncology* 25(22): 3230-3237.
11. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C et al. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) *Nucleic Acids Res.* 17 (7): 2503-16.
12. Whitcombe, D., Theaker J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech* 17: 804-807.

13. Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J. and Brown, T. (2000). Mode of Action and Application of Scorpion Primers to Mutation Detection. *Nucleic Acids Research* 28(19): 3752-3761
14. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol.* 2007, Nov. 12.
15. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006;66:3992-5.
16. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2008;26:374-9.
17. C. Bokemeyer et al., K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 4000)
18. E. Van Cutsem et al., K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 2)
19. S. Tejpar et al., Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 4001).
20. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008. "KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care". Christos Karapetis et al.
21. Rafael G. Amado, Michael Wolf, Marc Peeters, Eric Van Cutsem, Salvatore Siena, Daniel J. Freeman, Todd Juan, Robert Sikorski, Sid Suggs, Robert Radinsky, Scott D. Patterson and David D, Chang. Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 1626-1634.

Notas para o comprador:

Nem este produto, o TheraScreen® K-RAS Mutation, nem quaisquer dos seus componentes, podem ser revendidos ou de outra forma transferidos ou modificados para revenda, sem a aprovação por escrito da DxS Limited.

TheraScreen® e Scorpions® são marcas comerciais registadas da DxS Limited.

ARMS® é uma marca comercial registada da AstraZeneca UK Limited.

LIGHTCYCLER e ROCHE são marcas comerciais da Roche.

ABI7500 é uma marca comercial da Applied BioSystems.

Este produto é um dispositivo de diagnóstico com marca CE, em conformidade com a Directiva da União Europeia 98/79/CE para Dispositivos Médicos de Diagnóstico *in vitro*.

A compra deste produto é acompanhada por uma licença limitada não transferível para utilização das tecnologias ARMS® e Scorpions® apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.

ARMS® está coberto pelas patentes dos EUA 5.595.890 e EP 332435; Scorpions® pelas patentes dos EUA 6.326.145 e EP1088102.

As informações contidas neste documento estão sujeitas a alterações. A DxS Limited não se responsabiliza por quaisquer erros que possam aparecer neste documento. Em caso algum a DxS Limited assumirá qualquer tipo de responsabilidade (quer por contrato, acto ilícito (incluindo negligência) ou de outra forma) por quaisquer reivindicações apresentadas em relação a ou derivadas da utilização deste produto. Nenhum conteúdo deste documento exclui ou limita qualquer responsabilidade que seja ilegal que a DxS Limited exclua ou limite.

© Copyright 2009. DxS Limited. Reservados todos os direitos.

DxS Limited,
48 Grafton Street,
Manchester,
M13 9XX
Reino Unido

www.dxsdiagnostics.com

