


## Biomarcadores. Oncología. CCR. k-ras, Biomarcador decisivo, imprescindible y disponible.

tecnolab  
S.a.

 10 min.



El Cáncer colorrectal (CCR), es el tercer cáncer con más incidencia a nivel mundial. De los cánceres que afectan tanto a hombres como a mujeres el CCR es la segunda causa principal de muerte por cáncer en EEUU.

Normalmente la actividad del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) promueve el crecimiento del cáncer. En presencia de k-ras wild type (no mutado) los tratamientos anti EGFR inhiben la progresión del cáncer.



Bioq. Mónica Rodríguez  
Coordinadora División Patología y Anticuerpos



E-mail:  
mrodriguez@tecnolab.com.ar



Introducción

k-ras es la proteína codificada por el proto oncogen k-ras, el cual puede mutar en tumores sólidos. Se ha encontrado actividad de mutación en k-ras en 30-40 % de tumores colorrectales y esto se asocia a pobre respuesta a las terapias anti EGFR.

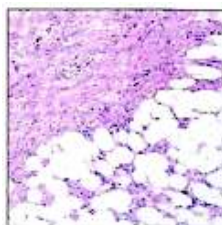
De esta forma el biomarcador K-ras es un marcador decisivo para predecir qué grupo de pacientes pueden o no beneficiarse de la terapia con anticuerpos monoclonales anti EGFR.

La detección de 7 mutaciones en codones 12 y 13 del oncogen k-ras es posible mediante un ensayo de real time PCR basado en la combinación de dos tecnologías ARMS (Amplification Refractory Mutation System) y Scorpions.

Flujo de Trabajo



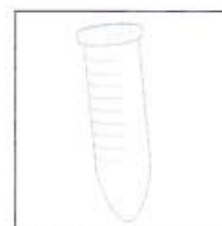
Step 1: Tumour biopsy and sample preparation



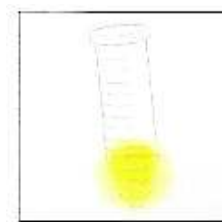
Step 2: Extract DNA



Step 3: ARMS: Selectively amplifies target



Step 4: Scorpions: Fluorescence indicates presence of mutation



A partir de una muestra de biopsia del tumor, posteriormente a la extracción del ácido nucleico se lleva a cabo una amplificación con tecnología ARMS, la cual discrimina entre el DNA wild type y el mutado, amplificando selectivamente la secuencia target. Esto es posible ya que los primer ARMS están diseñados complementariamente al DNA conteniendo la mutación.

De esta forma, al terminar la reacción de PCR, las únicas secuencias que se han amplificado han sido las secuencias mutadas, aun en muestras donde la mayoría de las secuencias no contienen la mutación.

# La línea más completa en microbiología



## Automatización total del laboratorio de microbiología

Siembra automatizada de muestras clínicas  
Coloración automatizada Gram **MUY PRONTO**  
Ziehl-Nielsen

## Medios de cultivo listos para usar

Placas preparadas. Botellas y tubos.  
**chromID** Placas cromogénicas

## Métodos manuales de identificación y pruebas de sensibilidad antibiótica

**api** | **Etest** | **SLIDEX** | *mycoplasma*

## Soluciones informáticas a medida para gestión y análisis epidemiológicos

**copemico** | **OBSERVA** | **myla** **MUY PRONTO**

## **BacT/ALERT 3D**

Sistema automatizado para hemocultivos  
y otros líquidos de punción

## **VITEK 2 compact**

Identificación y sensibilidad automatizada  
Un experto a su lado

## **VIDAS**

Calidad y flexibilidad en inmunoanálisis

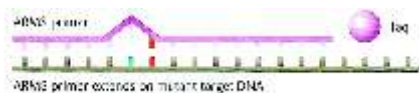
## Innovación en diagnóstico molecular

**NucliSENS EasyQ** Screening de MRSA - muy pronto: KPC  
**diversilab** Genotipificación microbiana  
**HAIN DNA•STRIP** Diagnóstico de tuberculosis

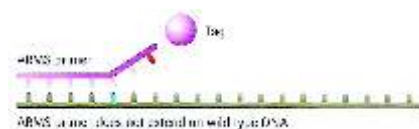
## ARMS Amplification Refractory Mutation System Reaction



ARMS primers are designed to anneal with DNA containing the mutation and allow Taq DNA polymerase to initiate a PCR reaction



ARMS primers do not amplify wild type DNA



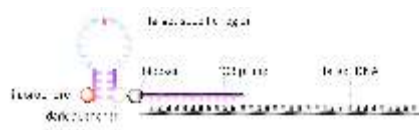
La detección de estas secuencias amplificadas se lleva a cabo usando Scorpions. Las moléculas Scorpions son moléculas bifuncionales que contienen un primer de PCR unido covalentemente a una sonda. El fluoróforo en la sonda, interactúa con un quencher, también incorporado en la sonda, que reduce la fluorescencia por cercanía física, cuando se encuentra en su conformación más estable.

Durante la PCR, cuando la sonda se une al amplicon, el fluoróforo y el quencher se separan y esto lleva al incremento en la fluorescencia en el tubo de reacción.

## Scorpions Reaction



Step 1: The Scorpion primer binds to a sequence upstream of the probe target region



## Step 2:

- The Scorpion primer is extended by DNA polymerase and the target region is copied
- The newly copied region is complementary to the probe at the 5' end of the Scorpion
- The blocking molecule stops DNA polymerase from copying the probe region

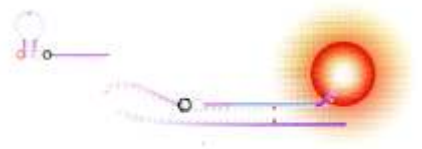


Step 3: The temperature increase within the real-time PCR instrument and the newly extended Scorpions primer denatures



## Step 4:

- The PCR reaction cools and the extended Scorpion undergoes an internal rearrangement to hybridise itself
- The fluorophore is no longer in close proximity to its quencher and it begins to fluoresce
- Any un-extended Scorpions re-anneal and are quenched



En resumen, acoplado la tecnología ARMS y las sondas Scorpions se obtiene una técnica específica y de alta sensibilidad para detectar las mutaciones de los oncogenes en un background de DNA genómico, con resultados totalmente confiables.

La sensibilidad (detección 1 % de DNA mutante) y el límite de detección (10 copias o menos) son superiores a otras tecnologías.

Los kits contienen un ensayo de control interno en cada pocillo. El mismo consiste en una reacción conteniendo un templado sintético "positivo", sus primers correspondientes y su sonda Scorpions marcada con el fluorocromo HEX. También se usa un control Positivo por cada ensayo mediante un templado sintético para cada DNA mutado y un control negativo (NTC) se usa para asegurar que la mezcla de reacción no esté contaminada.

En cuanto al análisis, se realiza un análisis de Ct en el control positivo, se evalúa el NTC en cuanto a la contaminación y también la performance del control interno antes de la evaluación de las muestras.

Los kits están validados para producir un resultado confiable dentro de una sensibilidad dada. Si se genera un resultado negativo, debe considerarse como negativo o por debajo del límite de detección del kit. No se requiere correr las muestras por triplicado o duplicado ya que un resultado negativo generado por una muestra es un resultado confiable.

El kit detecta 7 mutaciones en los codones 12 y 13:

1. Gly12Asp (GGT>GAT)
2. Gly12Ala (GGT>GCT)
3. Gly12Val (GGT>GTT)
4. Gly12Ser (GGT>AGT)
5. Gly12Arg (GGT>CGT)
6. Gly12Cys (GGT>TGT)
7. Gly13Asp (GGC>GAC)

Otros kits con idéntica tecnología:

## EGFR PCR Kit

Ensayo altamente selectivo para la detección de las 28 mutaciones somáticas más comunes en el gen EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

- El análisis incluye el análisis de 19 deleciones en el exón 19, L858R, L861Q, G719X, S768I y 3 inserciones en el exón 20

- Estas mutaciones cubren un alto porcentaje de todas las mutaciones que se ven en este gen en muestras tumorales



LABORATORY  
INFORMATION  
SYSTEM®

[www.nextlab.com.ar](http://www.nextlab.com.ar)

## Tecnología Integrada

Flexibilidad y poder de parametrización. Software abierto que puede integrarse con instrumentos de cualquier fabricante. Solución ideal para instituciones públicas y privadas al contemplar facturación e integración con sistemas hospitalarios. NextLAB® LIS se presenta en tres versiones: Lite, Professional y Enterprise.

 **NextLAB®**

SOFTWARE INTELIGENTE

LITE

PRO

ENT

Nicolás de Vedia 1644 1er. Piso "1" C1429EIB  
Nuñez, Buenos Aires, Argentina  
T. [+5411] 60 91 30 94 Rot  
F. [+5411] 60 91 21 00 Ext 3094

### B-RAF Mutation Test kit

Detecta la mutación V600E en el oncogen B-RAF.

### PI3K Mutation Test kit

Mutaciones en el oncogen PI3KCA fueron observadas en un gran número de diferentes tipos de cánceres como el cáncer de mama, de colon, de pulmón, de ovarios, de hígado y de estómago. El kit detecta 4 mutaciones diferentes en los exones 9 y 20. Estas son:

- H1047R (3140 A>G)
- E542K (1624 G>A)
- E545D (1635 G>T)
- E545K (1633 G>A)

El reto actual es la selección, entre todas las herramientas diagnósticas, de técnicas validadas y procedimientos standarizados para el análisis de mutaciones de k-ras.



tecnolab  
S.a.

### Bibliografía

Scorpions® is a registered trademark owned by DxS Limited

ARMS® is a registered trademark owned by AstraZeneca Limited

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonler DJ, et al. K-ras, Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. N Engl J Med 2008;359:1757-1765.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al: Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer: Results from a phase III trial of panitumumab compared to best supportive care. J Clin Oncol 2008;26:1626-1634.

Carmen J. Allegra, Testing for k-ras gene mutations in patients with CCRm to predict response to anti RGFR monoclonal antibody therapy, American Society Clinical Oncology, 2009

**MININEPH™ Binding Site PLUS**

## NEFELOMETRÍA PORTÁTIL



IgG  
IgG-LL  
IgA  
IgM  
C3  
C4  
IgG1  
IgG2  
IgG3  
IgG4  
Albúmina  
α-1- Antitripsina

Apolipoproteina A1  
Apolipoproteina B  
β2 Microglobulina  
C1 Inactivador  
Ceruloplasmina  
Haptoglobina  
Microalbumina  
Prealbumina  
Transferrina  
ASO  
CRP  
RF

**Freelite™**  
Serum Free Light  
Chain Assays



**V. TOKATLIAN S.A.**

Tte. Gral. J.D. Perón 4047/49 - C1198AAY Buenos Aires - Argentina  
Tel: +54 11 4862-5665 - Fax: 0800 333-4605 / +54 11 4865-7952  
ventas@vtokatliansa.com / info@vtokatliansa.com

Importa y distribuye