

UROMONITOR®

Uso previsto

El propósito de la prueba UROMONITOR® es detectar la recurrencia del carcinoma de vejiga no invasivo mediante la detección de mutaciones c.-124 C> T y c.146 C> T en el promotor del gen hTERT, mutaciones c.742C> T (R248C) y c.746C> G (S249C) en el gen FGFR3 y mutaciones en los codones G12 y Q61 del gen KRAS en el ADN derivado de células escamosas de vejiga presentes en la orina. Las muestras se procesan usando el paquete de preparación de orina, el paquete de obtención de ADN y el paquete de reactivo de PCR en tiempo real, realizado en uno de los equipos validados.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

La prueba UROMONITOR® se basa en tres procesos principales:

(1) Preparación de muestras de orina, (2) Aislamiento del ADN genómico escamado de la vejiga; y (3) Amplificación por RT-PCR del ADN objetivo usando cebadores complementarios y sondas oligonucleotídicas fluorescentes marcadas con fluorocromo. La detección de mutaciones se logra mediante el análisis de curvas de amplificación generadas por equipos de PCR en tiempo real. Se incluye un control mutante y un control negativo en cada reacción para controlar falsos negativos o falsos positivos analíticos, respectivamente.

Preparación de muestra de orina

Las muestras de orina se procesan por filtración usando una jeringa para pasar la orina a través de filtros donde las células quedan atrapadas.

Aislamiento de ADN

Se agrega una solución de lisis celular a cada filtro y se extrae en un tubo. El lisado filtrado se incuba con una proteasa y una solución de lisis caotrópica que libera ácidos nucleicos y protege el ADN de los ADN. El ADN se aísla uniéndose a una matriz de sílice de alta afinidad para los ácidos nucleicos. Después del lavado y la resuspensión, la cantidad de ADN genómico se determina por espectrofotometría y se ajusta a una concentración fija para agregar a la mezcla de amplificación / detección.

RT-PCR Amplificación y Detección

La prueba Uromonitor® utiliza 3 conjuntos de cebadores que definen una región promotora del gen TERT, una secuencia del gen FGFR3 y los exones 2 y 4 del gen KRAS en el ADN genómico humano (regiones diana). La amplificación se produce solo en las regiones diana correspondientes de los genes anteriores, entre cada conjunto específico de cebadores. Se utiliza un derivado de ADN polimerasa de la especie Thermus Z05 para la amplificación

de las regiones diana. Se preparan reacciones independientes para la detección de mutaciones c. -124 C> T y c.146 C> T en el promotor del gen hTERT y las mutaciones c.742C> T (R248C) y c.746C> G (S249C) en el gen FGFR3 y mutaciones en los codones G12 y Q61 de KRAS. Primero, la mezcla de reacción de PCR se calienta para desnaturalizar el ADN genómico y exponer las secuencias del cebador objetivo. A medida que la mezcla se enfría, los cebadores se unen a las secuencias de ADN objetivo y a cada sonda. La polimerasa específica se une a la ADN polimerasa mutada o de tipo salvaje correspondiente, en presencia de un ion metálico divalente y un exceso de dNTP, extendiendo cada cebador, sintetizando así una segunda cadena de ADN mientras escinde simultáneamente la sonda correspondiente. En el caso de reacciones dirigidas por mutación en FGFR3 y KRAS, a medida que la mezcla se enfría, la amplificación del alelo de tipo salvaje es bloqueada por un bloqueador específico de alelo de tipo salvaje y no se genera señal fluorescente. Este proceso se repite durante una serie de ciclos, con cada ciclo duplicando la cantidad de amplicón de ADN. El equipo de PCR en tiempo real detecta la cantidad de fluorescencia resultante de la unión y escisión de sondas específicas que se hibridan con productos de PCR específicos generados durante la amplificación. La sonda específica de secuencia de tipo salvaje se une a una secuencia de tipo salvaje. Cuando está vinculado a la secuencia objetivo, el informador HEX en el extremo 5' de la sonda está suficientemente cerca del desactivador del extremo 3' (BHQ1), no permitiendo que el informador emita fluorescencia. De manera similar, la sonda específica de secuencia mutante se une a una secuencia mutada. Cuando se enciende, el indicador FAM en el extremo 5' de la sonda está suficientemente cerca del interruptor final del extremo 3' (BHQ1), no permitiendo que el indicador emita fluorescencia. A medida que se produce la amplificación, las sondas unidas se cortan, lo que permite que el indicador fluorescente esté alejado del desactivador. Como el reportero ya no está bloqueado, el reportero emite fluorescencia que es detectada por el equipo de PCR en tiempo real.

ESTUDIOS DE VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN: EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO Y CLÍNICO

Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

La detección de mutaciones de precisión se evaluó mediante la prueba de las mismas muestras de orina (con resultados conocidos) por dos usuarios, utilizando dos lotes de reactivos distintos, en cinco días diferentes, por triplicado realizado el mismo día y en reacciones duplicadas en cada carrera. La evaluación mostró 100% de reproducibilidad y 100% de repetibilidad, con acuerdo sobre todos los resultados positivos y negativos para el operador, lotes, días, repeticiones y réplicas de reacciones.

Correlación con método de referencia

Se realizó un estudio para comparar los resultados analíticos obtenidos con la prueba Uromonitor® y la secuenciación de Sanger (método de referencia) utilizando ADN extraído de muestras de orina humana. Los resultados sobre

especificidad analítica y sensibilidad se resumen en los siguientes temas.

Sensibilidad analítica

La prueba Uromonitor® logró una sensibilidad analítica total del 100%, demostrada por el acuerdo de todos los resultados positivos con la secuenciación de Sanger (ausencia de falsos negativos).

Especificidad analítica

La prueba Uromonitor® logró una especificidad analítica del 100% para la detección de mutaciones TERT c.1-124C> T y c.1-146C> T y KRAS G12 y Q61, probadas al aceptar todos los resultados negativos con Sequencing de Sanger (ausencia de falsos positivos). Para la detección de las mutaciones FGFR3 R248C y S249C, la prueba logró una sensibilidad analítica del 86%, como resultado del acuerdo entre los resultados negativos obtenidos con el método de referencia (secuenciación de Sanger). Se ha demostrado que las muestras que llevan estas mutaciones son indetectables por el método de secuenciación de Sanger y se detectan mediante la prueba Uromonitor® y, en este sentido, la especificidad de esta referencia se ve afectada, pero esto se debe al mayor límite de detección de la prueba. en comparación con el método de referencia.

Límite "blanco" y límite de detección

Para evaluar el rendimiento de la prueba Uromonitor® en ausencia de una muestra y asegurar que una muestra en blanco no genere una señal analítica que pueda indicar una mutación, se evaluaron muestras de orina de donantes sanos (sin enfermedad y sin mutaciones), así como Reacciones de RT-PCR sin ADN. En el 100% de los casos, solo se obtuvieron resultados del promotor TERT "Sin detección de mutaciones" de los codones FGFR3 248 y 249 y los codones KRAS G12 y Q61.

Para evaluar el límite de detección de la prueba Uromonitor®, se analizaron muestras sintéticas que contenían una proporción cuantificable de ADN mutante a ADN de tipo salvaje. La evaluación ha demostrado que el ensayo detecta hasta un mínimo de 7% de ADN mutante cuando se diluye en ADN de tipo salvaje.

Evaluación clínica

Se realizó un estudio para comparar los resultados clínicos obtenidos con la prueba de Uromonitor® y la confirmación de cistoscopia y biopsia (método de referencia) en una cohorte de pacientes en vigilancia de recurrencia de carcinoma de vejiga no invasivo. Los resultados sobre la especificidad clínica y la sensibilidad se resumen a continuación:

Sensibilidad clínica

En todos los pacientes en los que se detectó recurrencia (mediante cistoscopia y confirmación de biopsia), la prueba de Uromonitor® fue positiva (sin falsos negativos), lo que resultó en una sensibilidad clínica del 100%.

Especificidad clínica

En pacientes sin recurrencia (cistoscopia o biopsia confirmada), la prueba de Uromonitor® fue negativa en el 97.7% de los casos y positiva en el 2.3% (tasa de falsos positivos).), lo que resulta en una especificidad clínica del 97,7%.

Valor predictivo negativo (VPN) y valor predictivo positivo (VPP)

Considerando la ausencia de falsos negativos, la prueba Uromonitor® presentó 100% de VPN. Dada la existencia de un residuo de falsos positivos, la prueba presentó un VPP de 87.5%.

Estabilidad

La estabilidad de la prueba Uromonitor® se ha evaluado con el tiempo en condiciones de almacenamiento, uso y transporte, lo que demuestra que el kit de filtración de orina, el kit de preparación de ADN y el kit de RT-PCR son mantenerse estable (en almacenamiento y en uso a las temperaturas recomendadas) durante hasta 24, 12 y 6 meses, respectivamente.