

## ESQUEMA SIMPLIFICADO DE TODO EL PROCESO

### PASO UNO:

Obtención de la muestra



Ver página 4

### PASO DOS:

Extracción de cfDNA de la muestra



Ver página 4-5

### PASO TRES:

Detección de mutaciones en gen KRAS



Ver página 6

### PASO CUATRO:

Visualización del resultado



Ver página 7-8



# 12KRAS-NET

REF DLKRS01

Versión 3.1

Almacene según su etiqueta individual

**\*Almacene los controles incluidos a  $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ \***



## Uso deseado

12KRAS-NET incluye lo necesario para extraer ADN circulante (ADNc) a partir de muestras de biopsia líquida (plasma) usando el kit de extracción cfDNA, detectar la presencia de mutaciones G12A, G12D, G12R, G12C, G12S y G12V del codón 12 del gen KRAS humano y su posterior visualización de los resultados mediante las tiras de Bionet multi.

## Introducción

KRAS (*Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*) es un gen humano que codifica una proteína llamada KRAS, la cual desempeña un papel crucial en la regulación de la señalización celular y está involucrada en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Cualquier alteración en su funcionalidad puede derivar en el crecimiento descontrolado de las células [1,2]. Se han asociado determinadas mutaciones en el codón 12 del gen KRAS con algunos tipos de cáncer en órganos como: colon, pulmón, páncreas entre otros [1]. La detección de mutaciones en el gen KRAS ha demostrado ser útil en el diagnóstico y tratamiento contra el cáncer generado por este, ya que puede ayudar a identificar que pacientes pueden responder o no a determinadas terapias dirigidas [2,3]. El empleo de ADN libre de células (ADNc) para la detección de genes se está posicionando como una opción precisa para guiar la atención clínica de los pacientes con cáncer debido a que es posible encontrar el ADN tumoral circulando como ADNc en muestras sanguíneas (biopsia líquida) lo que hace posible la detección por técnicas de biología molecular teniendo una alta sensibilidad y especificidad [4].

## Principio

**Extracción de ADNc:** El kit de extracción de cfDNA (REF KXCFD01) tiene la función de obtener ADN circulante (ADNc) aprovechando la carga de este, una propiedad química de los ácidos nucleicos, ya que estos poseen una carga negativa debido a los grupos fosfato presentes en su estructura, lo que permite capturar dicho material utilizando moléculas cargadas positivamente [5]. Las perlas magnéticas consisten en un centro de hierro recubierto por resina que confiere una carga positiva en su superficie, éstas se encuentran suspendidas en un buffer con cierto pH para mantener las cargas tanto de la superficie de las perlas magnéticas como la de los ácidos nucleicos, con ayuda del buffer de lisis celular (contiene agentes desnaturizantes de proteínas y lípidos) tendrá la función de facilitar a las perlas magnéticas capturar los ácidos nucleicos, una vez realizado dicho proceso con ayuda de un imán o magneto se atraerán los núcleos de hierro permitiendo la separación de las perlas del resto de componentes de la muestra (proteínas, lípidos entre otros) para luego eliminar dichos componentes por pipeteo. Mientras las perlas son retenidas en la pared del microtubo por el imán/magneto se realizará un proceso de lavado con el buffer de lavado, el cual, tiene la función de eliminar todos los componentes no deseados posteriormente se elimina todo el buffer de lavado para finalmente eluir las perlas magnéticas en una solución acuosa con pH básico con el fin de neutralizar el pH de las perlas liberando los ácidos nucleicos capturados [6].

**Detección de mutaciones en gen KRAS:** El 12KRAS-NET (REF DLKRS01), es un ensayo basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle (*LAMP por sus siglas en inglés*) que permite detectar la presencia de las mutaciones G12A, G12D, G12R, G12C, G12S y G12V del codón 12 del gen KRAS humano. La reacción de LAMP se realiza mezclando la muestra (ADNc) en un tubo con reactivo seco, luego se incuba a 65 °C en condiciones isotérmicas, si la muestra de ADNc contiene alguna de las mutaciones (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S o G12V) del codón 12 del gen KRAS humano en una concentración mayor al límite de detección se llevará a cabo el proceso de amplificación durante el cual se incorporan las marcas biotina-FAM. En caso contrario, de no estar presente o se encuentre por debajo del límite de detección no se realizará el proceso de amplificación ni tampoco el marcaje (etiquetado).

**Visualización del resultado:** Una vez concluido la detección, se utiliza el producto BIONET MULTI (REF DLBIO01). Para ello el producto de la amplificación es diluido en solución de corrimiento en el cual se colocará la prueba para que la muestra migre a través de ésta por acción capilar. Si la muestra contenía alguna de las mutaciones (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S o G12V) del codón 12 del gen KRAS humano las marcas biotina-FAM reaccionarán con las partículas recubiertas de anticuerpos anti-fluoresceína presentes en el conjugado, luego continuará migrando hasta encontrarse con los anticuerpos anti-biotina en la región de prueba (T), estos reaccionarán formando una línea de color en dicha región T, esto indica un resultado positivo debido a que fue detectado alguna de las mutaciones del codón 12 del gen KRAS humano. Por el contrario, si no hay alguna de las mutaciones del codón 12 del gen KRAS humano no habrá marcas de biotina-FAM y por lo tanto no se formará la línea de color en la región T, esto indica un resultado negativo. La prueba posee un control (C) que indica que se ha agregado la cantidad de muestra correcta y el procedimiento se ha realizado con éxito.

## INSTRUCCIONES DE USO

### PASO UNO: OBTENCIÓN DE MUESTRA

Para este ensayo se requieren **3 mL** (mililitros) de **plasma**, por lo tanto recolecte por venopunción sangre periférica siguiendo la metodología estandar, para ello puede emplear tubos con anticoagulante (EDTA/heparina) o tubos especiales para obtener ADNc, posteriormente separe por centrifugación a 3500 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos y coloque el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5-2 mL. Nota 1: Se recomienda que se tomen al menos 3 tubos de sangre periférica para asegurar la obtención de muestra suficiente.



### ANTES DE CONTINUAR

Es necesario que asegure la temperatura requerida en cada ensayo antes de emplear el termobloque, baño seco o incubadora, para ello consulte el **inciso m** de la sección 'Consideraciones adicionales' pág. 10.

### PASO DOS: EXTRACCIÓN DE ADNc DE LA MUESTRA

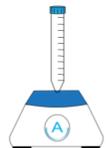
**PRECAUCIÓN:** Previo a la realización de este procedimiento es fundamental que si el ensayo no será realizado inmediatamente después de obtener el plasma, este sea almacenado a 2-8°C y no debe exceder 24 horas para su utilización, de lo contrario los resultados obtenidos pueden no ser certeros. Almacene a -20 °C para su uso a largo plazo y evite varios ciclos de congelación-descongelación.

Nota: Si la muestra (plasma) ha sido congelado durante su almacenamiento será necesario volver a centrifugar la muestra cómo se indicó en el **PASO UNO**.

A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el kit de extracción de cfDNA y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 8, sección **Contenido**.  
Nota: Permita que el buffer de lisis y de lavado alcancen temperatura ambiente, recuerde mezclar suavemente cada reactivo previo a su uso a excepción de las perlas magnéticas ya que estas requieren de una agitación vigorosa.

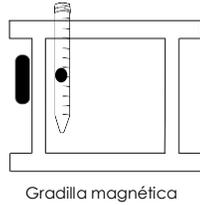
II. Tome un tubo falcón de 15 mL, coloque 3 mL de buffer de lisis y 3 mL de muestra (plasma), homogenice por pipeteo o vortex. Deje a temperatura ambiente por 5 minutos en un mezclador de tubos o mezcle por inversión ocasionalmente.



III. Agregue 60 µL de perlas magnéticas al tubo, cierre perfectamente y mezcle por vortex durante 1 minuto. Deje a temperatura ambiente por 5 minutos en un mezclador de tubos o mezcle por inversión ocasionalmente.

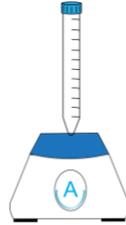
IV. Coloque el tubo falcon en una gradilla magnética, permita que el contenido se aclare (aprox. 5 minutos) luego retire completamente el sobrenadante sin quitar el tubo de la gradilla y sin llevarse las perlas magnéticas.

**Tip:** Si visualiza perlas magnéticas en el interior de la tapa, realice inversión un par de veces para arrastrar e incorporar dichas perlas a la solución.

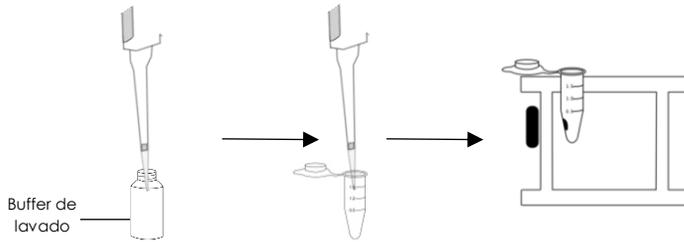


Gradilla magnética

V. Retire el tubo de la gradilla y agregue 1 mL de buffer de lisis, mezcle por vortex durante 30 segundos y para una mejor manipulación transfiera todo el contenido a un tubo de 1.5-2 mL y colóquelo en una gradilla magnética, permita que se aclare y retire el sobrenadante sin llevarse las perlas magnéticas. Considere emplear el tip del paso anterior si es necesario para recuperar el máximo de perlas magnéticas.



VI. Retire el tubo de la gradilla y agregue 600 µL de buffer de lavado, mezcle por vortex durante 30 segundos, regrese el tubo a la gradilla, permita que se aclare y retire el sobrenadante sin llevarse las perlas magnéticas.

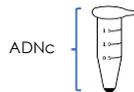


VII. Repita el paso VI, pero asegúrese de retirar completamente todo el sobrenadante sin llevarse las perlas magnéticas, deje el tubo abierto a temperatura ambiente aproximadamente 5 minutos o más hasta que se evaporen los residuos que no pudieron ser retirados. Finalmente, revise que no haya microgotas visibles ya que podrían inhibir las reacciones posteriores.

VIII. Agregue 50 µL de buffer de elución, resuspenda por pipeteo y luego mezcle por vortex por 1 minuto. Incube el tubo a 60-65 °C por 10 minutos mezclando por vortex ocasionalmente para evitar que se sedimenten las perlas magnéticas.

IX. Coloque el tubo en la gradilla magnética y permita que se aclare. Recolecte el sobrenadante (ADNc) y transfíralo a un tubo nuevo de un tamaño de su preferencia, rotúlelo y almacénelo en congelación (-20 °C) para su posterior uso.

**¡Felicidades ha obtenido su ADNc!**



### PASO TRES: DETECCIÓN DE MUTACIONES EN GEN KRAS

**PRECAUCIÓN:** El ADNc purificado puede ser utilizado inmediatamente luego de su obtención, en caso contrario debe ser almacenado a -20 °C y luego permitir que alcance temperatura ambiente antes de utilizarlo.

A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto 12KRAS-NET y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 8, sección **Contenido**.

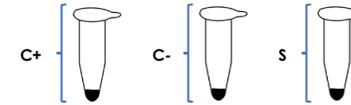
#### ANTES DE CONTINUAR

Coloque 50 µL de reactivo diluyente al control positivo (C+), homogenice por pipeteo y almacene a -20 °C ±5 °C hasta el momento de su uso.

II. Prepare cada tubo por separado según lo descrito.

- **Control positivo (C+) del ensayo:** Tome un tubo con reactivo seco y agregue 20 µL de reactivo diluyente, 5 µL de control positivo y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule con C+.
- **Control negativo (C-) del ensayo:** Tome un tubo con reactivo seco y agregue 20 µL de reactivo diluyente, 5 µL de control negativo y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule con C-.
- **Muestra (S):** Tome un tubo con reactivo seco y agregue 20 µL de reactivo diluyente, 5 µL de muestra (ADNc) y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule de tal forma que pueda identificarla.

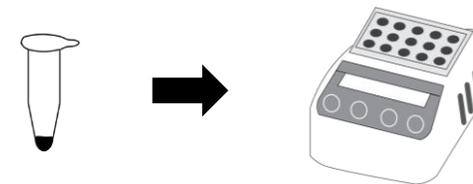
Nota: se recomienda realizar duplicados por cada muestra a analizar.



**ANTES DE CONTINUAR:** Visualice que cada uno de los tubos haya sido correctamente homogeneizado, es decir que no se vean zonas secas en el interior de los tubos.

III. Con ayuda del gotero con aceite mineral, coloque una gota de aceite en el interior de cada uno de los tubos, solo sobre su superficie sin mezclar. Es importante que la punta del gotero no toque la superficie de ningún tubo al momento de colocar la gota de aceite mineral. Posteriormente, colóquelos a **65 °C por 40 minutos** en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador.

**Nota:** Antes de que finalice el tiempo, prepare un recipiente con hielo triturado para que cuando termine el tiempo, saque los tubos del equipo y los coloque en dicho recipiente.



## PASO CUATRO: VISUALIZACIÓN DEL RESULTADO

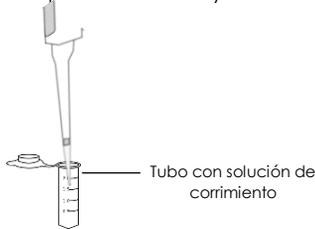
**PRECAUCIÓN:** Cada uno de los tubos generados del **PASO TRES** pueden ser utilizados inmediatamente, en caso contrario deben ser almacenados a -20 °C y luego permitir que alcance temperatura ambiente antes de utilizarlos.

A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

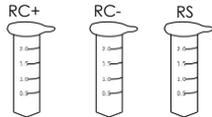
- I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto Bionet multi y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 8, sección **Contenido**.
- II. Tome los tubos con solución de corrimiento y asegure que toda la solución quede en el fondo, realizando movimientos fuertes al tubo.



- III. Recolecte **10 µL** del **tubo C+** y transfíralos a un tubo con solución de corrimiento, mezcle vortex por 5 segundos, cierre perfectamente y rotule nuevamente con RC+.



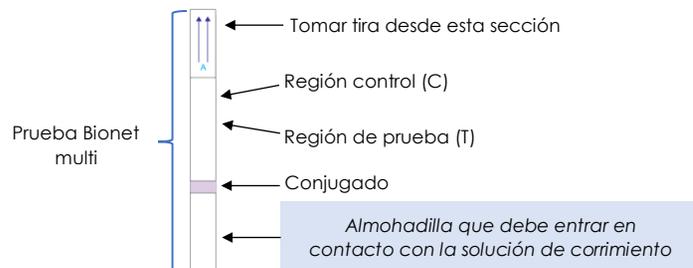
- IV. Repita este mismo procedimiento para cada uno de los tubos generados restantes según corresponde.



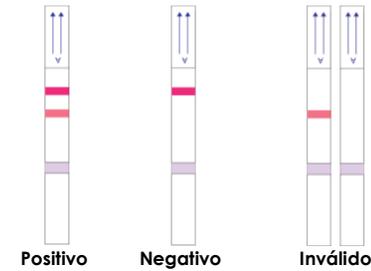
- V. Tome una prueba Bionet multi y rotúlela según el tubo con solución de corrimiento en el que la colocará (tubo elaborado en el paso anterior):

- Tira **S** para el tubo con solución de corrimiento que tiene la **muestra**.
- Tira **C+** para el tubo con solución de corrimiento que tiene el **control positivo**.
- Tira **C-** para el tubo con solución de corrimiento que tiene el **control negativo**.

Programa un temporizador por **3 minutos**.



- V. Una vez hayan pasado los 3 minutos, saque la prueba del tubo y colóquela sobre una superficie plana y limpia (limpie el excedente si es necesario), interprete los resultados.



## Resultados

<b>Control positivo (C+)</b>	<b>Resultado:</b> Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
<b>Control negativo (C-)</b>	<b>Resultado:</b> Únicamente se visualiza una línea de color en la región de control (C). Un resultado negativo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
<b>Muestra</b>	<b>Positivo:</b> Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Este resultado indica que se detectó alguna de las mutaciones (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S o G12V) del codón 12 del gen KRAS humano. <b>Nota:</b> Se considera un resultado positivo sin importar la intensidad de la línea de color en la región de prueba (T) siempre que sea visible. <b>Negativo:</b> Se visualiza una línea de color en la región de control (C). No se observa ninguna línea de color en la región de prueba (T). Este resultado indica que no se detectó ninguna de las mutaciones (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S o G12V) del codón 12 del gen KRAS humano.
<b>Inválido</b>	No se visualiza la línea de color en la región control (C).

## Contenido

Esta prueba proporciona los reactivos en las cantidades necesarias para procesar un total de 10 muestras con extracción, reacción y revelado. A continuación, se presenta el contenido por separado de los productos:

### INCLUIDOS

- **kit de extracción de cfDNA**
  - Buffer de lisis
  - Perlas magnéticas
  - Buffer de lavado
  - Buffer de elución
  - Tubos de 1.5-2 mL
  - Tubos falcon de 15 mL
- **12KRAS-NET**
  - Reactivo seco
  - Reactivo diluyente
  - Control negativo (C-)
  - Control positivo (C+)
  - Gotero con aceite mineral
- **Bionet multi**

### Reg. Sanitario 0037R2024 SSA

- Prueba en tira
- Tubos con solución de corrimiento

### REQUERIDOS PERO NO INCLUIDOS

- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Guantes de nitrilo
- Vortex
- Soporte magnético o imán de alta potencia
- Contenedor de RPBI
- Termobloque, baño seco o incubadora
- Equipo agitador
- Material para toma de muestra

**NOTA: Algunos de los reactivos/equipos pueden ser adquiridos en conjunto o por separado, para ello visite [www.amunef.com.mx](http://www.amunef.com.mx)**

#### Estabilidad y almacenamiento de los reactivos

- Almacene cada componente según lo indicado en su etiqueta impresa.
- La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.

#### Control de calidad

Un control interno está incluido en cada prueba de Bionet multi. Una línea de color aparece en la región control (C), este es el control interno del procedimiento, su función es confirmar que hubo suficiente cantidad de muestra y el procedimiento fue correcto. Esta prueba incluye controles, por lo que, se recomienda emplearlos en cada análisis de muestra como buena práctica de laboratorio.

#### Limitaciones

- Los resultados deben ser interpretados por personal calificado.
- La prueba es solo para uso profesional *in vitro*. Esta prueba cualitativa no puede determinar el valor cuantitativo ni la tasa de aumento en la concentración de ADNc proveniente de las mutaciones del gen KRAS.
- La tonalidad que adquiere la membrana no interfiere en el resultado, mientras la línea en la región control (C) se visualice el resultado es válido.
- Los resultados negativos no descartan la presencia de alguna mutación en el codón 12 del gen KRAS ya que la prueba está dirigida solo a la detección de las mutaciones G12A, G12D, G12R, G12C, G12S y G12V del gen KRAS en ADNc.
- El desempeño de la prueba se ha evaluado bajo las condiciones y características mencionadas en este instructivo. Siga las instrucciones para asegurar la precisión de los resultados.

#### Características de presentación

##### Precisión Intra-ensayo

La repetibilidad se determinó empleando un lote de 12KRAS-NET usando solución de corrimiento como muestra con diferentes concentraciones de un control positivo. Se realizaron 20 réplicas por cada concentración preparada, las muestras fueron correctamente identificadas el 99.99% de las veces.

##### Inter-Ensayo

La reproducibilidad se determinó con tres lotes de 12KRAS-NET empleando solución de corrimiento como muestra con diferentes concentraciones de un control positivo. Se realizaron 20 réplicas en dos días diferentes por cada concentración, las muestras fueron correctamente identificadas el 99.99% de las veces.

##### Sustancias interferentes

Los siguientes compuestos han sido probados usando 12KRAS-NET con muestras positivas y negativas, no se observó interferencia.

- Acetaminofén (20 mg/dL)
- Cafeína (20 mg/dL)
- Hemoglobina (1000 mg/dL)
- Bilirubina (1000 mg/dL)
- Ácido acetilsalicílico (20 mg/dL)
- Albúmina 10,500 (10,500 mg/dL)
- Colesterol (800 mg/dL)
- Ácido oxálico (600 mg/dL)
- Creatina (200 mg/dL)
- Triglicéridos (1,600 mg/dL)
- Ácido gástrico (20 mg/dL)
- Urea (103 mg/dL)

#### Desempeño

Se utilizó 12KRAS-NET para procesar un total de 237 muestras de las cuales solo 68 provenían de pacientes con sospecha de cáncer colorrectal y el resto (169) pertenecían a individuos sanos. Los resultados obtenidos fueron confirmados por medio de secuenciación y posteriormente se compararon:

MÉTODO	Secuenciación			
	Resultados	Positivo	Negativo	Total
12KRAS-NET	Positivo	65	1	66
	Negativo	3	168	171
	<b>Total</b>	68	169	237

Sensibilidad Relativa: 95.59% (95% IC: 92.17% - 97.55%)

Especificidad Relativa: 99.41% (95% IC: 97.37% - 99.87%)

Exactitud relativa: 98.31% (95% IC: 95.74% - 99.34%)

IC: Intervalo de confianza

#### Beneficios

- **Rapidez:** Mayor ahorro de tiempo con una alta reproducibilidad.
- **Simple:** Fácil operación con procesos cortos y escalable.
- **Eficiencia:** Una sola metodología que engloba el procesamiento, detección y visualización de los resultados.
- **Seguridad:** Ningún producto químico de este kit es tóxico.
- **Versatilidad:** El ADNc purificado con este kit es funcional no solo para su propio ensayo (LAMP) sino también para una gran variedad de aplicaciones como: PCR convencional y variantes, RPA, NGS, secuenciación con bisulfito entre otros.

#### Consideraciones adicionales

- Asegúrese de utilizar la cantidad indicada de muestra para la prueba, ya que demasiada o muy poca muestra puede conducir a una desviación de los resultados.
- Es necesaria la extracción de cfDNA previo al análisis para obtener mejores resultados.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otras pruebas disponibles comercialmente. Los componentes de esta prueba se combinan con precisión para un rendimiento óptimo.
- Las micropipetas y consumibles deben ser estériles. Se recomienda irradiar con luz UV por 15 minutos antes de su uso, las micropipetas previamente limpiadas con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.
- Se recomienda el uso de equipo de protección al trabajar muestras.
- PRECAUCIÓN: Permita que los reactivos y las muestras se descongelen completamente antes de su uso. Mezcle el reactivo suavemente antes de usar teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese a su temperatura de almacenamiento después de su uso.
- PRECAUCIÓN: No deje abierto el contenedor de las pruebas Bionet multi, solo ábrala hasta su uso, la presencia de humedad puede afectar el desempeño de la prueba.
- Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los tubos.
- Calibre las micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas diferentes de micropipeta en cada muestra y reactivo para evitar contaminación cruzada.
- La prueba podría verse afectada por el polvo, reactivos químicos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etanol, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice puntas nuevas de preferencia con filtro.
- Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) puede garantizar la seguridad del personal.
- Todos los productos de desecho generados por esta prueba deben disponerse de acuerdo a la NOM-087 vigente sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos.

- m) Coloque un tubo de 1.5-2 mL con 1 mL de agua destilada en el termobloque, baño seco o incubadora con la temperatura deseada a usar, espere 10 minutos y coloque un termómetro en el interior del tubo, si el termómetro indica la temperatura deseada a utilizar proceda a emplearlo para su ensayo. En caso contrario ajuste, espere y vuelva a medir hasta alcanzar la temperatura deseada.

#### Dudas, preguntas y consejos

- **¿Puedo utilizar muestras de cfDNA purificado con otros kits? R:** No, el ensayo LAMP puede verse inhibido por determinadas sustancias presentes en algunos buffers de elución incluidos en dichos kits, solo si puede eluir el cfDNA en el paso final en agua grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8 es que será posible usar ese cfDNA independientemente del método utilizado.
- **¿Cuánto tiempo es viable si guardo a -20°C el cfDNA purificado con el producto kit de extracción de cfDNA? R:** Puede ser viable hasta dos años como máximo, si desea que sea viable por tiempo indefinido debe almacenarlo a -80°C. Evite realizar muchos ciclos de congelamiento y descongelamiento.
- **¿Por qué no debo llevarme las perlas magnéticas? R:** Las perlas magnéticas mantienen la unión de forma directa con el cfDNA que se desea extraer, si durante el proceso se llevan dichas perlas causará que el cfDNA obtenido sea muy poco y puede no ser funcional para el ensayo.
- **¿Cuándo puedo retirar el tubo de la gradilla magnética durante el proceso de extracción de cfDNA? R:** El imán de la gradilla magnética tiene la función de aglomerar todas las perlas magnéticas para hacer más sencilla la tarea de retirar el sobrenadante en cada uno de los pasos, por lo tanto, puede retirar el tubo una vez que haya retirado el sobrenadante indicado para agregar el siguiente reactivo.
- **¿Debo incluir controles cada vez que analizó una muestra? R:** Sí, los controles aseguran que el proceso llevado a cabo fue el correcto. Es por ello que puede esperar hasta obtener más muestras e ir extrayendo su cfDNA para su posterior uso en el ensayo LAMP.
- **¿Cómo puedo ser más eficiente al momento de realizar los ensayos? R:** Puede colocar los reactivos que comparten todos en vez de uno por uno como sucede con el reactivo diluyente del **paso tres**, pero no mezcle ya que eso lo hará al final cuando coloque la muestra o control con su respectivo cambio de punta de micropipeta para evitar reactividad cruzada.
- **¿Qué pasa si dejo mis tubos por más tiempo o temperatura indicada en el termobloque, baño seco o incubador? R:** El ensayo LAMP es sensible, en caso de que esto ocurra, los resultados obtenidos pueden verse afectados y será necesario repetir el ensayo y descartar esos tubos.

#### Referencias

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 65:87–108. 2015. Chang YS, Er TK, Lu HC, Yeh KT, Chang JG. Detection of KRAS codon 12 and 13 mutations by mutant-enriched PCR assay. *Clin Chim Acta.* 2014 Sep 25;436:169-75. doi: 10.1016/j.cca.2014.05.008. Epub 2014 May 24. PMID: 24863805.
2. Kocián P, Sedivcová M, Drgáč J, Cerná K, Hoch J, Kodeř R, Bartůřková J, Spšek R, Fialová A. K-ras mutace a nádory infiltrující lymfocyty u karcinomu kolon, současnost a výhledy [K-ras mutational status and tumour-infiltrating lymphocytes in human colon cancer: state of the art and future perspectives]. *Rozhl Chir.* 2012 Aug;91(8):427-32. Czech. PMID: 23153426.
3. Itonaga M, Matsuzaki I, Warigaya K, Tamura T, Shimizu Y, Fujimoto M, Kojima F, Ichinose M, Murata S. Novel Methodology for Rapid Detection of KRAS Mutation Using PNA-LNA Mediated Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS One.* 2016 Mar 21;11(3):e0151654. doi: 10.1371/journal.pone.0151654. PMID: 26999437; PMCID: PMC4801409.

4. Chan, R. H., Lin, P. C., Chen, S. H., Lin, S. C., Chen, P. C., Lin, B. W., Shen, M. R., & Yeh, Y. M. (2021). Clinical Utility of a Cell-Free DNA Assay in Patients With Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology*, 11, 589673. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.589673>
5. Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
6. Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics* 10: 311-316.

#### Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso
	Solo para evaluación de desempeño <i>in vitro</i>
	Almacenar entre 2 – 8 °C
	No utilizar si el paquete está dañado
<b>UPI</b>	Uso para investigación

	Caducidad
<b>REF</b>	Número de catálogo
<b>LOT</b>	Número de lote
	No reutilizar