



**República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional**

2019 - Año de la Exportación

**Disposición**

**Número:**

**Referencia:** 1-47-3110-4050-17-2

---

VISTO el expediente N° 1-47-3110-4050-17-2 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

**CONSIDERANDO:**

Que por los presentes actuados la firma BIOCIENTÍFICA S.A solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Productos para diagnóstico de uso in vitro denominado: **ELUCIGENE CF-EU2v1**.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE  
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

**D I S P O N E:**

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico de uso in vitro denominado: **ELUCIGENE CF-EU2v1** de acuerdo con lo solicitado por la firma BIOCIENTÍFICA S.A, con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorícense los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2019-47870263-APN-DNPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM N° 78-191”, con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTICULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

#### DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

Nombre comercial: ELUCIGENE CF-EU2v1.

Indicación de uso: ENSAYO DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA Y SIMULTANEA DE DIFERENTES MUTACIONES DEL GEN HUMANO REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANOSA DE LA FIBRÓISIS QUÍSTICA EN ADN EXTRAÍDO DE MUESTRAS DE SANGRE ENTERA (EDTA) Y DE MANCHAS DE SANGRE SECA.

Forma de presentación: envases por 10 o [50] determinaciones, conteniendo: CF-EU2v1 primer mix A (1 x 50 µl) o [2 x 120 µl], CF-EU2v1 primer mix B (1 x 50 µl) o [2 x 120 µl], PCR master mix (2 x 75 µl) o [2 x 400 µl] y DNA control (1 x 50 µl).

Período de vida útil y condición de conservación: VEINTICUATRO (24) meses desde la fecha de elaboración, conservado a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .

Nombre y dirección del fabricante: ELUCIGENE DIAGNOSTICS. Citylabs, Nelson Street, M13 9NQ, Manchester. (REINO UNIDO).

Condición de Venta/Categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Expediente N° 1-47-3110-4050-17-2

Digitally signed by BELLOSO Waldo Horacio  
Date: 2019.12.10 09:35:12 ART  
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL  
ELECTRONICA - GDE  
Date: 2019.12.10 09:35:14 -03:00



Elucigene.com

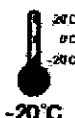


**Elucigene**  
**Diagnostics**

**CF-EU2v1**



XXXXXXXXXXXX



-20°C

**REF**

CF2EUBX

**LOT**

XXXXXXXXXX



10

**Elucigene**  
**Diagnostics**

Elucigene Diagnostics  
Citylabs Nelson Street  
Manchester M13 9NQ United Kingdom

**REF**

TA 450043  
TB 450044  
TM 450045  
DC 404489

**LOT**

XXXXXX XXXXXXXXXXXX  
XXXXXX XXXXXXXXXXXX  
XXXXXX XXXXXXXXXXXX  
XXXXXX XXXXXXXXXXXX



Dr. HECTOR M. QUIROZ  
BIOQUIMICO - Mat. 7.335  
DIRECTOR TECNICO



Elucigene.com

**CF-EU2v1**  
Elucigene

**Elucigene**  
**Diagnostics**

**CF-EU2v1**

XXXXXXXXXXXX



**REF**  
CF2EUB2

**LOT**  
XXXXXX

**Σ**  
50

**Elucigene**  
**Diagnostics**

Elucigene Diagnostics  
Citylabs Nelson Street  
Manchester M13 9NQ United Kingdom

	<b>REF</b>	<b>LOT</b>	<b>Σ</b>
TA	404473	XXXXXX	XXXXXXXXXXXX
TB	404474	XXXXXX	XXXXXXXXXXXX
TM	404480	XXXXXX	XXXXXXXXXXXX
DC	404489	XXXXXX	XXXXXXXXXXXX

Dr. HECTOR M. QUIROZ  
BIOQUIMICO - Mat. 7.335  
DIRECTOR TECNICO



## RÓTULOS

### **Rótulos externos:**

#### 1 - Nombre del producto

**Elucigene CF-EU2v1**

#### 2 - Establecimiento importador y/o elaborador. Nombre del director Técnico, domicilio legal y en caso de productos importados totalmente terminados, acondicionados localmente o fraccionados deberá constar el origen de elaboración

**Establecimiento importador:** Biocientífica S.A.  
Iturri 232/4 Buenos Aires  
Argentina - CP 1427  
Teléfono: 4857-5005

**Director Técnico:** Bioq.-Farm. Héctor Quiroz

**Elaborador:** Elucigene Diagnostics  
Citylabs  
Nelson Street  
Manchester M13 9NQ  
Reino Unido

#### 3 - Leyenda "Autorizado por el M.S. y A.S.":

Uso profesional exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. PM-78-191

#### 4 - Número de lote o partida:

LOT

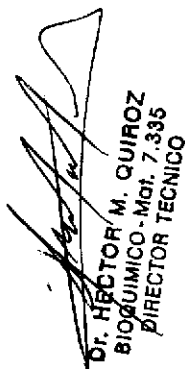
#### 5 - Fecha de Vencimiento



#### 6 - Constitución del equipo:



10

  
Dr. HÉCTOR M. QUIROZ  
BIOQUÍMICO - Mat. 7.335  
DIRECTOR TÉCNICO



50

## 7 - Conformación del equipo

### X 10 Tests:

1. (TA): 1 x 50 µl de CF-EU2V1 primer mix A
2. (TB): 1 x 50 µl de CF-EU2v1 primer mix B
3. (TM): 2 x 75 µl of PCR Master Mix
4. (DC): 1 x 50 µl vial DNA Control

### X 50 Tests:

1. (TA): 2 x 120 µl de CF-EU2V1 primer mix A
2. (TB): 2 x 120 µl de CF-EU2v1 primer mix B
3. (TM): 2 x 400 µl of PCR Master Mix
4. (DC): 1 x 50 µl vial DNA Control

## 8 - Leyenda "Uso Diagnóstico In-Vitro"



## 9 - Descripción de la finalidad de uso

Para la detección cualitativa in vitro simultánea de mutaciones del gen humano regulador de la conductancia transmembranosa de la fibrosis quística (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, CFTR) en ácido desoxirribonucleico (ADN).

## 10 - Descripción de las precauciones



## 11 - Condiciones de conservación



-20°C

Dr. HECTOR M. QUIROZ  
BIOQUIMICO - Mat. 7.335  
DIRECTOR TECNICO

# Elucigene Diagnostics

## Elucigene® CF-EU2v1

### Instrucciones de uso

Producto	Cantidad	Código de catálogo
Elucigene CF-EU2v1	50 ensayos	CF2EUB2
Elucigene CF-EU2v1	10 ensayos	CF2EUBX

*[Firma]*  
Dr. Hector M. Quiroz  
Biotecnico - Mat. 7.335  
DIRECTOR TECNICO



Para uso diagnóstico *in vitro*



Fabricado por:  
Elucigene Diagnostics  
Citylabs  
Nelson Street  
Manchester  
M13 9NQ

Para ventas, servicio al cliente y asistencia técnica:

T: +44 (0) 161 669 8122

F: +44 (0) 161 669 8129

E: [enquiries@elucigene.com](mailto:enquiries@elucigene.com)

E: [techsupport@elucigene.com](mailto:techsupport@elucigene.com)



Elucigene Diagnostics es el nombre comercial de Delta Diagnostics (UK) Limited., una empresa registrada en Inglaterra y Gales con el número 8696299.



## Índice

### Sección 1: Introducción

Representación en el país .....	5
Uso indicado .....	6
Resumen y explicación .....	7
Principios del procedimiento .....	8
Explicación de los símbolos utilizados .....	9

### Sección 2: Materiales, advertencias y precauciones

Materiales suministrados .....	10
Materiales necesarios pero no suministrados .....	11
Advertencias y precauciones .....	12
Preparación y almacenamiento del kit.....	12

### Sección 3: Procedimiento del ensayo de productos CF-EU2v1

Recogida y almacenamiento de las muestras .....	13
Preparación y almacenamiento de las muestras .....	13
Concentración de ADN .....	13
Descripción del protocolo .....	15
Protocolo de la prueba: procedimiento de amplificación .....	16
Protocolo de la prueba: electroforesis capilar.....	18
Genetic-Analyzer ABI3130.....	19
Genetic-Analyzer ABI3500.....	20
Configuración de la hoja de muestras para GeneMarker .....	21
Análisis e interpretación de resultados.....	22



## Sección 4: Guía de análisis del software GeneMapper

Introducción .....	24
Proceso de análisis .....	27
Importación de archivos de datos sin procesar .....	28
Análisis de archivos de datos sin procesar .....	29
Revisión de datos del producto .....	30
Puntuación de los picos de diagnóstico .....	31
Designación de marcadores de GeneMapper .....	33
Modificación del archivo de parámetros de análisis .....	34

## Sección 5: Guía de análisis del software GeneMarker

Introducción .....	36
Importación de la configuración del panel de GeneMarker del producto .....	37
Proceso de análisis .....	38
Adición de archivos de muestras al GeneMarker .....	39
Procesamiento de datos .....	40
Run Wizard: creación de una plantilla de ejecución .....	40
Run Wizard: procesamiento de datos .....	41
Run Wizard: configuraciones adicionales .....	41
Cuadro de procesamiento de datos .....	42
Ventana de análisis principal .....	43
Análisis y previsualización del informe de GeneMarker .....	44
Etiquetas de los picos .....	49
Puntuación de los picos de diagnóstico .....	49
Designación de marcadores de GeneMarker .....	49

Dr. M. G. GARCÍA  
Químico - Mdt. 7.335  
DIRECTOR TÉCNICO

---

## Sección 6: Rendimiento del ensayo

Descripción .....	51
Precisión: características de rendimiento .....	51
Validación interna .....	51
Precisión: repetibilidad .....	54
Precisión: reproducibilidad .....	55

## Sección 7: Limitaciones

Ámbito del ensayo .....	57
Sensibilidad analítica: cantidad recomendada de ADN introducido .....	57
Especificidad analítica: sustancias con capacidad interferente .....	57
Especificidad analítica: reactividad cruzada .....	58

## Sección 8: Bibliografía

Referencias .....	59
Descargo de responsabilidad .....	60

## Anexo A: Detalles de marcadores

Marcadores detectados .....	61
-----------------------------	----



## Sección 1: Introducción

### Representación en el país

#### Promotor de Australia:

Southern Cross Diagnostics,  
Unit 3,  
41 Green Street,  
Banksmeadow,  
NSW 2019,  
Australia

1800 146 900

[www.scdiagnostics.com.au](http://www.scdiagnostics.com.au)

Dr. HECTOR M. QUIROZ  
BIOQUÍMICO - Matr. 7-335  
DIRECTOR TÉCNICO

## Uso indicado

Para la detección cualitativa *in vitro* simultánea de las siguientes mutaciones del gen humano regulador de la conductancia transmembranosa de la fibrosis quística (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, CFTR) en ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído de muestras de sangre entera (EDTA preservado) y de manchas secas de sangre:

Tabla 1.

Tradicional	De acuerdo con las directrices HGVS*	
	Nombre del cDNA	Nombre de la proteína
CFTRdele2,3	c.54-5940_273+10250del (c.54-5940_273+10250del21080)	
E60X	c.178G>T	p.Glu60X
P67L	c.200C>T	p.Pro67Leu
G85E	c.254G>A	p.Gly85Glu
394delTT	c.262_263del (c.262_263delTT)	p.Leu88IlefsX22
444delA	c.313del (c.313delA)	p.Ile105SerfsX2
R117C	c.349C>T	p.Arg117Cys
R117H	c.350G>A	p.Arg117His
Y122X	c.366T>A	p.Tyr122X
621+1G>T	c.489+1G>T	
711+1G>T	c.579+1G>T	
L206W	c.617T>G	p.Leu206Trp
1078delT	c.948del(c.948delT)	p.Phe316LeufsX12
R334W	c.1000C>T	p.Arg334Trp
R347P	c.1040G>C	p.Arg347Pro
R347H	c.1040G>A	p.Arg347His
A455E	c.1364C>A	p.Ala455Glu
I507del	c.1519_1521del (c.1519_1521delATC)	p.Ile507del
F508del	c.1521_1523del (c.1521_1523delCTT)	p.Phe508del
1677delTA	c.1545_1546del (c.1545_1546delTA)	p.Tyr515X
V520F	c.1558G>T	p.Val 520Phe
1717-1G>A	c.1585-1G>A	
G542X	c.1624G>T	p.Gly542X
S549R(T>G)	c.1647T>G	p.Ser549Arg
S549N	c.1646G>A	p.Ser549Asn
G551D	c.1652G>A	p.Gly551Asp
R553X	c.1657C>T	p.Arg553X
R560T	c.1679G>C	p.Arg560Thr
1811+1.6kbA>G	c.1680-886A>G	
1898+1G>A	c.1766+1G>A	
2143delT	c.2012del (c.2012delT)	p.Leu671X
2184delA	c.2052del (c.2052delA)	p.Lys684AsnfsX38
2347delG	c.2215del (c.2215delG)	p.Val739TyrfsX16
W846X	c.2538G>A	p.Trp846X
2789+5G>A	c.2657+5G>A	

\* con referencia a: *Mutation Nomenclature in Practice: Findings and Recommendations from the Cystic Fibrosis External Quality Assessment Scheme*. Berwouts S, et al. *Human Mutation*. Vol.00, No. 0, 1-7 (2011)

Para obtener más información sobre los kits en el rango del CF-EU2V1 visite:

### Resumen y explicación

La fibrosis quística afecta a los epitelios en varios órganos, lo que da lugar a una patología multisistémica compleja que incluye el páncreas exocrino, los intestinos, el aparato respiratorio, el aparato genital masculino, el sistema biliar y las glándulas sudoríparas exocrinas. La expresión patológica varía según la gravedad del CFTR mutaciones (2), los modificadores genéticos (3) y los factores ambientales (4). Dicha expresión abarca desde muerte en la primera infancia como resultado de enfermedad pulmonar obstructiva progresiva con bronquiectasias, hasta insuficiencia pancreática con enfermedad pulmonar obstructiva gradualmente progresiva durante la adolescencia y una mayor frecuencia en la hospitalización por enfermedad pulmonar en la edad adulta temprana, pasando por sinusitis y bronquitis recurrentes o infertilidad masculina en adultos jóvenes.

Más comúnmente, el diagnóstico de la fibrosis quística se establece en personas con una o más características fenotípicas de CF más evidencia de una anomalía de la función CFTR basada en uno de los siguientes: presencia de dos mutaciones causantes de enfermedad en el gen CFTR o dos valores de cloruro en sudor por iontoforesis de pilocarpina cuantitativa anormal ( $>60$  mEq/L) o mediciones de diferencia de potencial nasal (NPD) transepitelial típicas de CF. La tasa de detección de mutación CFTR varía en función del método de ensayo y el origen étnico. En algunos individuos sintomáticos, solo una o ninguna mutación causante de enfermedad es detectable; en algunos portadores, la mutación causante de enfermedad no es detectable.

Los trastornos relacionados con CFTR se heredan en forma autosómica recesiva. Los hermanos de un índice con fibrosis quística tienen un 25 % de probabilidades de verse afectados, un 50 % de probabilidades de ser portadores

asintomáticos y un 25 % de probabilidades de no verse afectados y de no ser portadores. En programas de cribado de la población, se utilizan pruebas genéticas moleculares de mutaciones causantes de la enfermedad en el gen CFTR para la detección de portadores. Se dispone de pruebas prenatales para embarazos con un riesgo aumentado de enfermedades relacionadas con CFTR si existen casos conocidos de mutaciones causantes de la enfermedad en la familia.

Desde el descubrimiento del gen CFTR en 1989 (5), se han descrito más de 1700 mutaciones y variantes en el gen (6). Muchas de estas mutaciones son "privadas", habiendo sido descritas solamente en un paciente y/o familia. La prueba sistemática de todas las posibles mutaciones no es ni viable ni rentable, por lo que una tal prueba se limita al análisis de las mutaciones más comunes. El CF-EU2v1 es un kit de prueba para la fibrosis quística diseñado específicamente para el análisis de las mutaciones más comunes encontradas en poblaciones de origen europeo. El ensayo identifica 50 mutaciones en total y también analiza la pista poli-T del intrón 9 con una medición exacta de la repetición TG adyacente.

La pista de timidina polimórfica en la unión del intrón 9 y del exón 10 influye en la transcripción. El número de residuos de timidina (5T, 7T o 9T) afecta a la eficacia de la separación (splicing) del exón 10; si el alelo 5T está presente, faltará una proporción de transcritos del exón 10, lo que dará lugar a proteína no funcional y a síntomas de CF variables. Se ha informado que el número de repeticiones 5' de TG a la pista de politimidina puede también influir en la separación de exón 10 (7). Si está presente en el mismo alelo como la variante 5T, cuanto más largo sea el número de repeticiones de TG mayor será la proporción de transcritos de CFTR a los que les falta el exón 10. El número de repeticiones de TG puede determinarse con el CF-EU2v1 midiendo el tamaño de los picos del amplicón 5T.

## Principios del procedimiento

El método empleado por el kit Elucigene CF-EU2v1 utiliza la tecnología de amplificación específica de alelos ARMS (Amplification Refractory Mutation System, sistema de detección de mutaciones refractarias a la amplificación) fluorescente, que detecta mutaciones puntuales, inserciones o deleciones en el ADN (8). El principio de ARMS es que los oligonucleótidos con un residuo desigual 3' no funcionarán como iniciadores de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en determinadas condiciones. La selección de los oligonucleótidos adecuados permite amplificar y detectar secuencias mutantes o normales de ADN específicas. Las secuencias amplificadas (amplicones) se separan mediante electroforesis capilar usando un Genetic-Analyzer de Applied Biosystems. El software de análisis permite identificar a los amplicones y etiquetarlos de acuerdo con su tamaño y el color de su colorante.

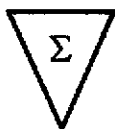
Elucigene CF-EU2v1 es un ensayo multiplex que consta de dos reacciones de RCP (A y B). En la mezcla A se detectan cincuenta secuencias mutantes dentro del gen CFTR, que se visualizan como picos de amplicones de color azul. En la mezcla B se detectan las secuencias normales (naturales) no mutadas correspondientes, que se visualizan como picos de amplicones de color verde. La mezcla A también detecta la secuencia normal para la mutación que se observa con mayor frecuencia, causante de fibrosis quística en poblaciones caucásicas, llamada F508del, que se visualiza como un pico de amplicón de color verde. Además, en la mezcla A se detectan las secuencias repetidas poli-T, que se visualizan como picos de amplicones de color negro. Para monitorizar la eficacia de la amplificación de las muestras, se incluyen en las mezclas A y B marcadores internos de control de la amplificación (fibrosis no quística), que se visualizan como picos de amplicones de color rojo.

## Explicación de los símbolos utilizados

Los símbolos utilizados en todas las etiquetas y envases cumplen el estándar armonizado ISO 15223



Fabricante



Número de pruebas



Consultar las instrucciones de uso

X°C

Almacenar por debajo de la temperatura indicada



Usar antes de la fecha indicada



Código de catálogo



Número de lote



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



## Sección 2: Materiales, advertencias y precauciones

### Materiales suministrados

Almacene todos los componentes por debajo de -15 °C, en una unidad con control de temperatura configurada para que funcione a -20 °C.

Cada kit contiene:

- (TA): 2 x 120 µl (50 pruebas) o 1 x 50 µl (10 pruebas) de mezcla de iniciadores A de CF-EU2V1, que contienen iniciadores para amplificar los siguientes alelos mutantes R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, F508del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, S549R(T>G), M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X y R1158X. Esta mezcla también contiene iniciadores naturales para la detección del alelo F508del normal, iniciadores para la detección de las variantes de la politimidina, IVS8-5T, IVS8-7T, IVS8-9T e iniciadores para la identificación de 2 marcadores hipervariables de repeticiones en tándem cortos (STR, short tandem repeat).
- (TB): 2 x 120 µl (50 pruebas) o 1 x 50 µl (10 pruebas) de mezcla de iniciadores B de CF-EU2v1, que contienen iniciadores naturales para amplificar los alelos normales de los mutantes amplificados mediante la mezcla de iniciadores A con la excepción del F508del, el alelo normal, que es amplificado mediante los iniciadores incluidos en la mezcla de iniciadores A. Esta mezcla también contiene iniciadores para la identificación de 2 marcadores STR hipervariables.
- (TM): 2 x 400 µl (50 pruebas) o 2 x 75 µl (10 pruebas) de mezcla maestra de RCP, que contienen polimerasa de ADN HotStart Taq y trifosfatos desoxinucleótidos en tampón.
- (DC): 1 vial x 50 µl de control de ADN (6ng/µl), normal para las mutaciones detectadas por el Elucigene CF-EU2v1.

Tabla 2. Contenido del kit

Kit	Código de catálogo	N.º de referencia del componente			
		(TA)	(TB)	(TM)	(DC)
Elucigene CF-EU2v1 (50T)	CF2EUB2	404473	404474	404480	404489
Elucigene CF-EU2v1 (10T)	CF2EUBX	450043	450044	450045	404489

## Materiales necesarios pero no suministrados

### Generales

Consumibles de laboratorio: guantes, tubos de microcentrifugadora con tapón enroscable, viales o placas de microvaloración de RCP de 0,2 ml recomendadas por el fabricante del termociclador utilizado, puntas de pipeta.

Equipo de laboratorio: pipetas de precisión (2 juegos: 1 para la manipulación previa a la amplificación y 1 para la manipulación posterior a la amplificación; preferiblemente pipetas de desplazamiento positivo), ropa protectora, agitadora vortical, microcentrifugadora, centrifugadora de placas de microvaloración de 96 pocillos.

### Extracción de ADN

Preparación del ADN: Mini kit de ADN QIAamp (Qiagen GmbH, n.º de cat. 51304/51306) o equivalente. 1 x tampón TE (pH 8,0)

### Amplificación por RCP

Termociclador para alojar placas de microtitulación de 96 pocillos o viales de 0,2 ml con una precisión de temperatura de  $\pm 1$  °C entre 33 °C y 100 °C y uniformidad de temperatura estática de  $\pm 1$  °C. El CF-EU2v1 se ha validado y mostrado que funciona de acuerdo con las especificaciones en las plataformas de termociclador recomendadas siguientes:

- Applied Biosystems GeneAmp 9700
- Applied Biosystems Veriti Dx (funcionando en régimen normal)
- Applied Biosystems Veriti Dx (funcionando en régimen de simulación 9700)
- Applied Biosystems Proflex (funcionando en régimen normal)

**Nota:** El equipo termociclador deberá mantenerse regularmente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y calibrarse para garantizar un rendimiento óptimo y un ciclado exacto de RCP. El ensayo Elucigene CF-EU2v1 se desarrolló en termocicladores 9700 de Applied Biosystems. El usuario deberá comprobar y evaluar completamente el rendimiento óptimo de otras marcas y modelos antes de notificar resultados con el CF-EU2v1.

### Electroforesis capilar

Electroforesis capilar: polímero POP-7 (Nº catálogo ABI 4352759), 10 tampones analizadores genéticos (Nº catálogo ABI 402824) y formamida Hi-Di (Nº catálogo ABI 4311320), GeneScan 600v2 LIZ estándar de tamaño (Nº catálogo ABI 4408399) y DS-33 (conjunto de colorantes G5) matriz estándar (Nº catálogo ABI 4345833).

Analizadores genéticos ABI 3130 y 3500 de Applied Biosystems (con software GeneMapper), matriz capilar de 36 cm (matriz capilar de 50 cm para Genetic-Analyzer 3500), placas ópticas de 96 pocillos, septos de 96 pocillos y casetes de 96 pocillos.

### Análisis de datos

Se requiere uno de los paquetes de software de análisis de datos siguientes: GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems Inc.) o superior o GeneMarker 1.65 (SoftGenetics LLC) o superior.

### Documentación adicional del producto Elucigene

En estas instrucciones de uso se incluye una sección sobre la interpretación de los resultados obtenidos. Una guía complementaria a la interpretación con ejemplos se encuentra disponible en el sitio web de Elucigene:

[www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/](http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/)

## Advertencias y precauciones

1. El ADN de control normal incluido en los kits fue sometido a ensayos independientes con resultados negativos para el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 1 y 2.
2. Debe tenerse precaución al manipular material de origen humano. Todas las muestras deben considerarse potencialmente infecciosas. Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que el VHB, VHC, VIH u otros agentes infecciosos estén ausentes.
3. La manipulación de muestras y componentes de pruebas, su uso, almacenamiento y eliminación deben realizarse de acuerdo con los procedimientos definidos por las normativas o pautas de seguridad nacionales relativas a peligros biológicos.
4. En línea con las buenas prácticas de laboratorio actuales, los laboratorios deben procesar sus propias muestras de control de calidad interno de genotipo conocido en cada ensayo, para así poder evaluar la validez del procedimiento.
5. Si la caja del kit está dañada, es posible que el contenido esté dañado también; no utilice el kit y póngase en contacto con el servicio al cliente.

## Preparación y almacenamiento del kit

El almacenamiento de los reactivos debe realizarse en un área sin productos de ADN o RCP contaminantes.

Almacene todos los componentes por debajo de  $-15^{\circ}\text{C}$ , en una unidad con control de temperatura configurada para que funcione a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un lugar oscuro. Los colorantes fluorescentes utilizados en este producto son fotosensibles y debe reducirse al mínimo su exposición a la luz. Todos los reactivos se suministran listos para usar.

Evite congelaciones y descongelaciones repetidas.

## Sección 3: Procedimiento del ensayo de productos CF-EU2v1

### Recogida y almacenamiento de las muestras

Se han evaluado muestras ADN extraídas de sangre entera (EDTA) y de manchas secas de sangre para que sean compatibles con esta prueba. Se ha informado de que los dispositivos de recogida de muestras en ocasiones han resultado perjudiciales para la integridad de determinados analitos y podrían interferir con algunas tecnologías metodológicas (9). Se recomienda que cada usuario se asegure de que el dispositivo elegido se utilice de acuerdo con las instrucciones del fabricante y de que los dispositivos de recogida de muestras sean compatibles con esta prueba.

Las muestras de sangre deben almacenarse a -20 °C antes de la preparación del ADN. Evite congelaciones y descongelaciones repetidas.

### Preparación y almacenamiento de las muestras

El ensayo Elucigene CF-EU2v1 se ha validado con ADN extraído con los kits Qiagen QIAamp. Se recomienda evaluar por completo los métodos de extracción de ADN y los tipos de muestras alternativos con la prueba Elucigene CF-EU2v1 previo uso de los resultados para fines diagnósticos.

#### Muestras de sangre entera (EDTA)

Se obtienen resultados de forma sistemática con ADN extraído con el kit de sangre de ADN QIAamp 96 (o el mini kit de ADN QIAamp usando proteinasa K) siguiendo el protocolo, según se describe en el QIAamp Handbook, pero comenzando con 200 µl de sangre entera líquida y diluyendo en 200 µl de 1 x tampón TE (pH 8,0).

#### Muestra de manchas secas de sangre

Se obtienen resultados de forma sistemática con ADN extraído con el mini kit de ADN QIAamp, siguiendo el protocolo según se describe en el QIAamp Handbook, pero comenzando con 2 discos de 3 mm procedentes de una mancha seca de sangre y diluyendo en 100 µl de 1 x tampón TE (pH 8,0).

### Concentración de ADN

Utilizando las condiciones de la RCP recomendadas y la configuración de inyección de muestras (consulte la nota en la sección Electroforesis capilar) especificadas en los módulos de ejecución de la columna capilar, se obtienen regularmente resultados aceptables con la cantidad de ADN introducido de 6 ng/µl. Sin embargo pueden obtenerse resultados interpretables con un rango de ADN introducido entre 1,5 ng/µl y 18 ng/µl.

La cuantificación del ADN es muy importante, y deberá medirse la concentración de cada muestra de ADN que se va a analizar para garantizar resultados óptimos. Técnicas como fluorescencia de PicoGreen o absorbancia UV son aceptables. Debido a la variación en las técnicas de cuantificación de ADN, el usuario deberá considerar la siguiente guía orientativa:

Las cantidades muy altas de ADN introducido aumentarán la probabilidad de que el software de análisis etiquete los picos de segundo plano. Para reducir la probabilidad de que se etiqueten los picos de segundo plano pueden darse los siguientes pasos.

- Diluya la muestra de ADN y vuelva a amplificarla.
- Reduzca el tiempo de inyección (consulte el apartado Electroforesis capilar).
- Aumente el umbral mínimo de amplitud de pico (consulte la guía del software correspondiente)

Las cantidades muy bajas de ADN introducido aumentarán la probabilidad de que los picos de diagnóstico sean débiles y de que el software de análisis no los etiquete. Para aumentar la señal pueden darse los siguientes pasos.

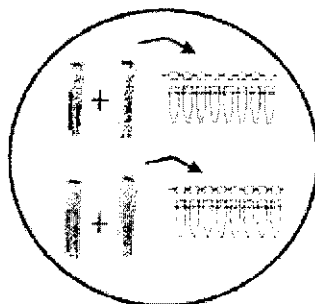
Dr. Hector M. Quiroz  
BIOQUÍMICO - Mot. 7.335  
DIRECTOR TÉCNICO

- Aumente el tiempo de inyección (consulte el apartado Electroforesis capilar).
- Vuelva a extraer la muestra y dilúyala en un volumen reducido.
- Aumente el número de manchas de sangre para extracción.

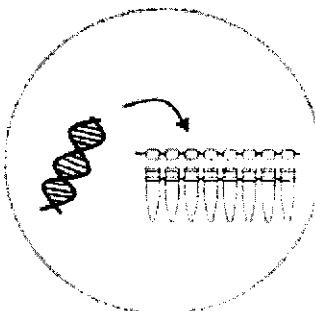
**Nota:** Consulte la Guía de solución de problemas de Elucigene CF-EU2v1 para más información.

## Descripción del protocolo

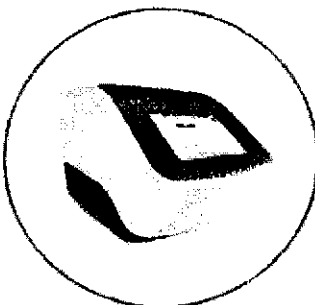
Preparar y dispensar  
mezclas de reacciones de  
CF-EU2v1



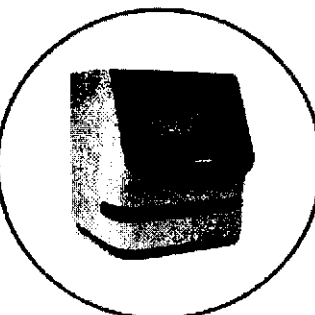
Adición de ADN



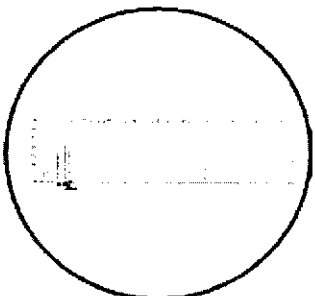
RCP



Electroforesis capilar



Resultados del análisis



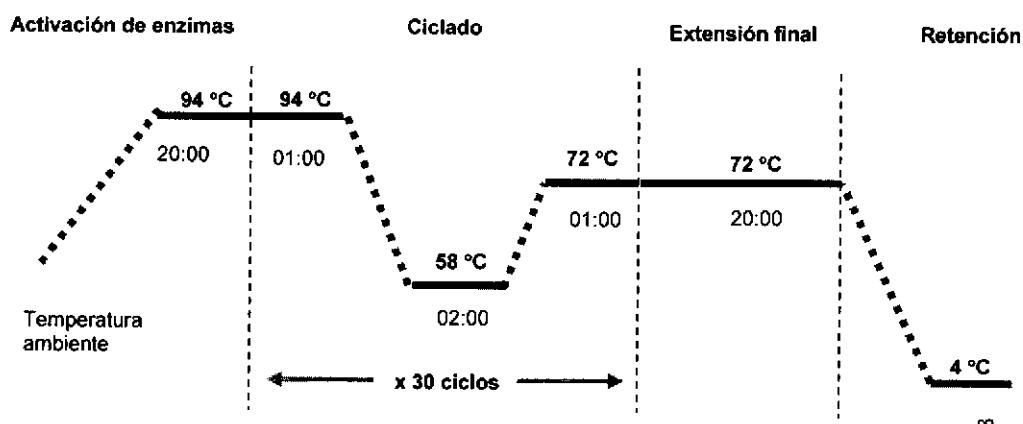
Dr. HECTOR M. QUIROZ  
BIOQUÍMICO - Mat. 7.335  
DIRECTOR TÉCNICO

## Protocolo de la prueba: procedimiento de amplificación

**Nota:** Para reducir al mínimo el riesgo de contaminación, los pasos 3 a 5 deben llevarse a cabo en un área libre de ADN. Deberán también tomarse medidas para evitar la contaminación con producto RCP.

1. Programe el termociclador para un ciclo de paso único para activar la polimerasa de ADN a 94 °C durante 20 minutos unido a un programa de ciclado de amplificación de 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 2 minutos a 58 °C (hibridación) y 1 minuto a 72 °C (extensión) durante 30 ciclos. Esto debería asociarse a un archivo de retardo de tiempo de 20 minutos a 72 °C (extensión) en el ciclo final.

**Figura 1.** Programa de RCP del CF-EU2v1



2. Debe incluirse un control (agua) negativo en cada ejecución de RCP. También puede considerarse adecuado incluir otros controles, como p. ej. positivo normal (suministrado por el ADN de control).
3. Descongele las mezclas de iniciadores y la mezcla maestra de RCP y centrifugue brevemente para recoger el contenido en el fondo de los viales. Mezcle suavemente en una agitadora vortical y centrifugue brevemente los viales de nuevo. Prepare suficiente mezcla de reacción para el número de muestras y controles que se van a analizar (tabla 3).

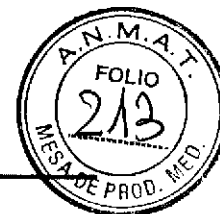
**Tabla 3.** Preparación de la mezcla de reacción

		Número de muestras de ADN que se va a analizar			
		1	10	25	50
Mezcla de reacción A	[TA] Mezcla de iniciadores (µl)	4,5	45	112,5	225
	[TM] Mezcla maestra RCP (µl)	7,5	75	187,5	375

		Número de muestras de ADN que se va a analizar			
		1	10	25	50
Mezcla de reacción B	[TB] Mezcla de iniciadores (µl)	4,5	45	112,5	225
	[TM] Mezcla maestra RCP (µl)	7,5	75	187,5	375

**Nota:** La mezcla maestra RCP es viscosa y deberá tenerse cuidado para garantizar que se manipulen los volúmenes correctos. Se recomienda que la mezcla maestra RCP se añada a mezclas de iniciadores previamente dispensadas para garantizar que se dispense todo el líquido de la pipeta a la mezcla de iniciadores. No utilice diferentes mezclas o componentes de diferentes lotes de kit CF-EU2v1.

4. Pipetee 10 µl de cada mezcla de reacción al fondo de las placas o viales de RCP de 0,2 ml adecuadamente etiquetados.



5. Utilizando puntas de pipeta separadas, añada 2,5 µl de ADN de prueba a un vial de muestra con 10 µL de mezcla de reacción A y de nuevo a un vial con 10 µL de mezcla de reacción B. Repita esta acción con todas las muestras que se van a analizar.
6. No añada ADN al vial de RCP para el control negativo; en su lugar añada 2,5 µl de agua estéril destilada.
7. Centrifugue brevemente los viales hasta que todo el líquido esté en la parte inferior de cada vial.
8. Coloque los viales firmemente en el bloque del termociclador. Inicie el ciclo de paso único a 94 °C, seguido del programa de ciclado de amplificación (consulte el paso 1).

**Nota:** Si el amplicón no va a analizarse por electroforesis en el plazo de un par de horas después del proceso de RCP, conserve las muestras entre 2 °C y 8 °C (en el bloque del termociclador o en el refrigerador).

  
Dr. Alfonso M. Quiroz  
BIOQUÍMICO - Mdt. 7.335  
DIRECTOR TÉCNICO



## Protocolo de la prueba: electroforesis capilar

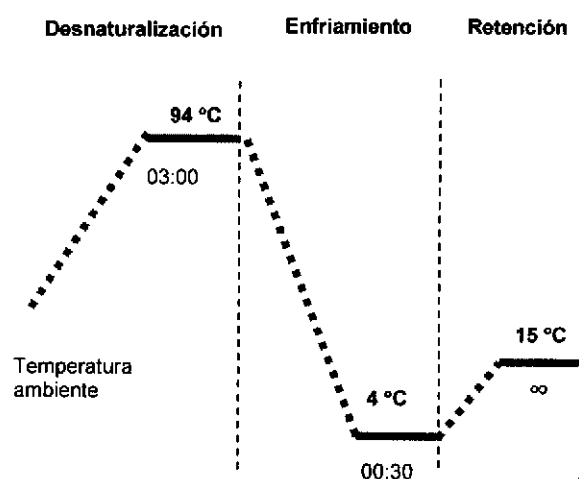
Se recomienda que cada usuario se asegure de que el equipo elegido se utilice de acuerdo con las instrucciones del fabricante y sea compatible con esta prueba. En este contexto los parámetros clave son el polímero y la matriz capilar. Pueden obtenerse resultados óptimos utilizando las siguientes condiciones de electroforesis capilar en el Genetic-Analyzer ABI3130 o ABI3500:

1. En una sola inyección, suficiente para 16 pocillos, combine 6,8 µl del estándar de tamaño GS600v2 LIZ con 250 µl de formamida Hi-Di y mezcle a fondo. Dispense 15 µl de la mezcla en cada pocillo de una placa óptica de 96 pocillos.
2. Añada 3 µl de producto de RCP procedente de cada una de las amplificaciones de las muestras A y B a pocillos separados que contengan el estándar de tamaño/mezcla de formamida (del paso 1) ya dispensados en la placa.
3. Desnaturalice el producto de RCP dispensado en la placa óptica en un termociclador utilizando los siguientes parámetros: 94 °C durante 3 minutos asociado a 4 °C durante 30 segundos.
4. Centrifugue la placa a 1000 g durante 10 segundos para eliminar cualquier burbuja de los pocillos y cárguela en el Genetic-Analyzer.

**Nota:** Es esencial que los pocillos no utilizados (es decir, pocillos no cargados con una muestra de ADN) todavía estén cargados con formamida Hi-Di para garantizar que los capilares no se sequen.

**Nota:** Los ajustes de inyección de muestra pueden modificarse para adaptarse a la cantidad de amplicón producida durante la RCP, que puede variar debido a la cantidad añadida de ADN genómico introducido. Puede aplicarse menos amplicón a la columna para análisis reduciendo el tiempo o el voltaje de inyección. Por el contrario, puede aplicarse más amplicón a la columna para análisis aumentando el tiempo o el voltaje de inyección. Las muestras amplificadas previamente se pueden volver a inyectar varias veces para nuevos análisis.

Figura 2. Programa de desnaturalización de RCP



## Genetic-Analyzer ABI3130

1. Cree el módulo capilar de 36 cm: módulo de ejecución CF-EU2 en el Module Manager (Administrador de módulos) del software de recogida de datos 3130. Asegúrese de que esté seleccionado lo siguiente:

- Type (Tipo): Regular
- Template (Plantilla): FragmentAnalysis36\_POP7

2. Introduzca los ajustes detallados en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Configuración del módulo 3130

N.º	Nombre del parámetro	Valor	Rango
1	Oven Temperature (Temperatura del horno)	60	int 18...65 °C
2	Poly_fill_Vol. (Volumen de llenado poli)	6500	6500...38000 pasos
3	Current Stability (Estabilidad de corriente)	5,0	int 0...2000 uA
4	PreRun_Voltage (Voltaje de preejecución)	15,0	0...15 kV
5	Pre_Run_Time (Tiempo de preejecución)	180	1...1000 s
6	Injection_Voltage (Voltaje de inyección)	3,0	1...15 kV
7	Injection_Time (Tiempo de inyección)	12**	1...600 s
8	Voltage_Number_Of_Steps (Número de pasos de voltaje)	20	1...100 nk
9	Voltage_Step_Interval (Intervalo de paso de voltaje)	15	1...60 s
10	Data_Delay_Time (Tiempo de retardo de datos)	60	1...3600 s
11	Run_Voltage (Voltaje de ejecución)	15,0	0...15 kV
12	Run_Time (Tiempo de ejecución)	1200	300...14000 s

*Aumente el tiempo de inyección a 36 segundos para el análisis del ADN extraído de manchas de sangre*

3. Cree el protocolo CF-EU2 en el Protocol Manager (Administrador de protocolos), asegurándose de que esté seleccionado lo siguiente:

- Type (Tipo): Regular
- Run Module (Módulo de ejecución): CF-EU2 (consulte el módulo de ejecución anterior)
- Dye Set (Conjunto de colorantes): G5

4. Para ejecutar las muestras, cree una hoja de muestras utilizando el Plate Manager (Administrador de placas) y asegúrese de que esté seleccionado el protocolo correcto como protocolo del instrumento (consulte más arriba).

5. Proceda a crear una hoja de muestra utilizando el software de recogida de datos 3130 con la configuración siguiente:

- Sample Name (Nombre de la muestra): debe ser el mismo nombre o número específico de la muestra.
- Run owner (Propietario de ejecución): seleccione el propietario predeterminado para el laboratorio.
- Run protocol (Protocolo de ejecución): CF-EU2 (contiene el módulo de ejecución CF-EU2 3130).

- Nota:** Es necesario crear un módulo donde se indique la configuración del instrumento y luego asignar esto a un protocolo de ejecución en el cual se haya seleccionado el conjunto de colorantes G5. Para obtener más información sobre cómo crear módulos de ejecución, por favor consulte el Manual de usuario del instrumento.
- Nota:** El "Run time" (Tiempo de ejecución) necesario variará dependiendo de la temperatura ambiente del lugar en el que se haya instalado el Genetic-Analyzer. Para más información sobre cómo crear módulos de ejecución, consulte el Manual del usuario del Genetic-Analyzer 3130 de Applied Biosystems.
- Nota:** Para obtener más información sobre la configuración, funcionamiento y localización de defectos en el instrumento, consulte el Manual del usuario del Genetic-Analyzer 3130 de Applied Biosystems.

## Genetic-Analyzer ABI3500

Es necesario crear un Instrument Protocol (Protocolo de instrumento) CF-EU2, que luego pueda utilizarse para cada ejecución CF-EU2v1. Cree el Instrument Protocol (Protocolo de instrumento) CF-EU2 a través de la biblioteca de protocolos del instrumento 3500.

Asegúrese de que esté seleccionado lo siguiente:

- Run Module (Módulo de ejecución): FragmentAnalysis50\_POP7
- Introduzca la configuración detallada en la imagen siguiente:

**Figura 3.** Configuración del protocolo 3500

8 seconds CFEU2v1 3500xL Dx 24 cap - Edit Instrument Protocol 8 seconds CFEU2v1 3500xL Dx 24 cap

Setup an Instrument Protocol

Instrument Protocol Setup Help

Application Type: **Fragment** Capillary Length: **50** cm Polymer: **POP7**

Dye Set: **G5** ☐ Disable Name Filter

Instrument Protocol Properties

\* Run Module: **FragmentAnalysis50\_POP7** Run Modules for 24 capillary are only available in the list.

\* Protocol Name: **8 seconds CFEU2v1 3500xL Dx 24 cap** ☐ Locked

Description:

Oven Temperature (°C): <b>60</b>	Run Voltage (kVolts): <b>19.5</b>	PreRun Voltage (kVolts): <b>15</b>	Injection Voltage (kVolts): <b>3.0</b>
Run Time (sec.): <b>1300</b>	PreRun Time (sec.): <b>180</b>	Injection Time (sec.): <b>8</b>	Data Delay (sec.): <b>1</b>

Advanced Options

Close Apply to Assay Save to Library

*Aumente el tiempo de inyección a 36 segundos para el análisis del ADN extraído de manchas de sangre*

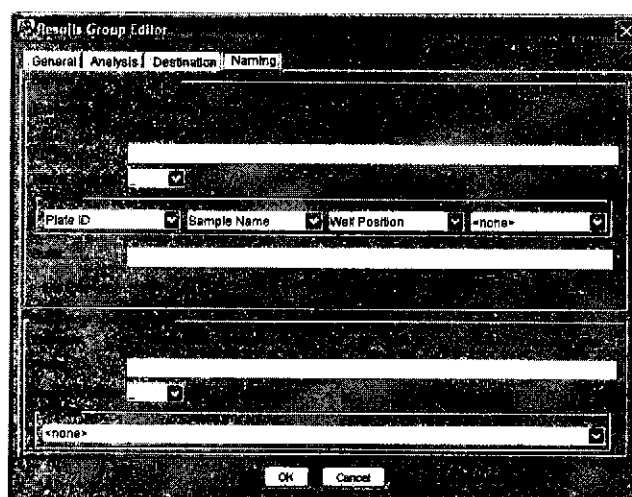
Para ejecutar las muestras, cree una placa de muestras haciendo clic en "Create Plate from Template" (Crear placa a partir de plantilla) en el "Dashboard" (Panel de control), y asegúrese de que se haya asignado el protocolo de instrumento correcto para CF-EU2v1 (consulte más arriba).

## Configuración de la hoja de muestras para GeneMarker

El software GeneMarker permite la comparación directa entre los datos A y B del mismo individuo. Para facilitar esto, es importante que la asignación de un nombre al archivo de salida de datos sin procesar (FSA) sea uniforme en todas las muestras y mezclas. La hoja de muestras deberá contener el nombre único de cada muestra que se está analizando con el sufijo \_A o \_B dependiendo de la mezcla que se esté analizando. Si se va a incluir la ID de la placa en el nombre FSA, deberá usarse un formato fijo cada vez (p. ej., CFEU2 DDMMAAAA).

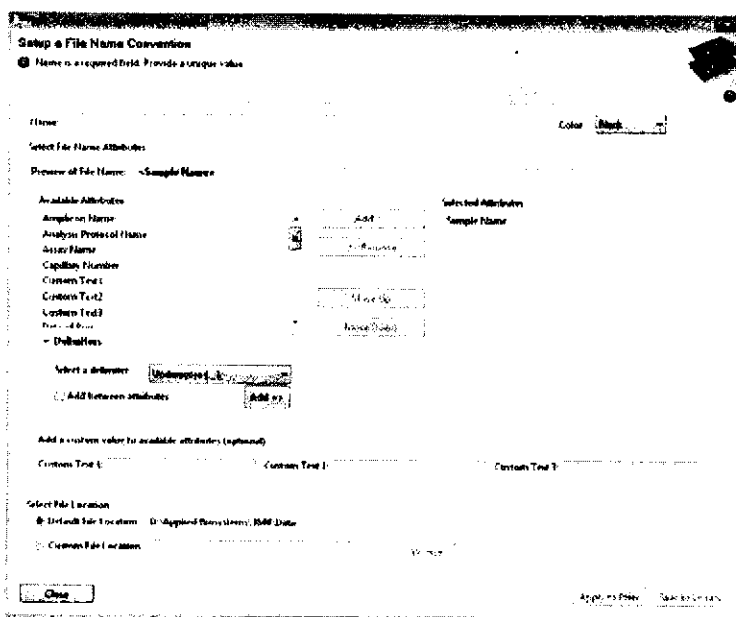
En el 3130, los parámetros "Results Destination" (Destino de los resultados) deberán configurarse de manera que el nombre de la muestra se incluya en el nombre del archivo FSA (p. ej., CFEU2 DDMMAAAA\_1234,5\_A\_A01).

Figura 4. 3130 Destino de los resultados



En el 3500, la convención para nombres de archivos deberá configurarse de manera que el nombre de la muestra se incluya en el nombre del archivo FSA (p. ej., CFEU2 DDMMAAAA\_1234,5\_A\_A01).

Figura 5. 3500 Nombre de archivos



## Análisis e interpretación de resultados

Se recomienda que cada laboratorio desarrolle sus propios criterios y procedimientos de notificación e interpretación.

### Interpretación de resultados generales

Los productos RCP se observan como un sistema de etiquetado con 5 colorantes utilizando el conjunto de filtros G5. El conjunto de filtros G5 detecta los fragmentos etiquetados 6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo) y PET (rojo), además del marcador de estándar de tamaño etiquetado con LIZ (naranja) en un electroferograma y en el programa GeneMapper o GeneMarker.

**Nota:** Diferentes combinaciones de instrumentos, polímeros y estándares de tamaño pueden hacer que el tamaño especificado varíe ligeramente. Durante la validación del kit, el usuario debe comprobar que la configuración del bin predeterminada dé lugar a un etiquetado de pico preciso y ajustarlo si es necesario. En caso de cualquier dificultad, póngase en contacto con Asistencia técnica ([techsupport@elucigene.com](mailto:techsupport@elucigene.com)) para obtener asesoramiento.

Una vez finalizada la recogida de datos, los fragmentos de CF-EU2v1 RCP deberán compararse con el estándar de tamaño GS600v2 LIZ utilizando el software de análisis de fragmentos.

Durante la recogida de datos, los fragmentos de RCP se observarán como picos azules (mutantes) o verdes (naturales) en el electroferograma de datos sin procesar. Cada individuo tiene dos copias del gen CFTR. Cuando estas copias tienen la misma secuencia para cualquier sitio dado, un individuo se describe como homocigoto respecto a ese sitio. Cuando las copias difieren en la secuencia en un sitio dado, un individuo se describe como heterocigoto respecto a ese sitio.

Los resultados de la mezcla A (mutante) determinan si un individuo es portador de una mutación y esto viene indicado por la presencia de un pico azul. La mezcla mutante contiene también iniciadores del alelo F508 normal, por lo que esta mezcla puede determinar si un individuo es normal respecto a F508 (pico verde solamente), homocigoto respecto a F508del mutante (pico azul solamente) o heterocigoto respecto a F508del (picos azul y verde).

Si se observa cualquier otra mutación, se pueden analizar los resultados de la mezcla B (natural) para determinar el estado de homocigoto o heterocigoto. La presencia de un pico verde para el alelo en cuestión en la mezcla natural indica que el individuo es heterocigoto y la ausencia de un pico verde indica que el individuo es homocigoto para la mutación en cuestión.

En la sección Elucigene CF-EU2v1 Guide to Analysis Software (Guía Elucigene CF-EU2v1 del software de análisis) se proporcionan pautas detalladas adicionales para la configuración del software, el análisis y la interpretación.

Tabla 5. Descripción de canales

Canal	Color del pico	Descripción
6-FAM		Los picos observados en este canal indican la presencia de una mutación detectada por el ensayo CF-EU2v1 (solo mezcla A).
VIC		Los picos observados en este canal indican la presencia de una secuencia natural detectada por el ensayo CF-EU2v1 (solo mezcla B, con la excepción de F508del que está presente en la mezcla A).
NED		Los picos observados en este canal indican la presencia de variantes alélicas poli-T: 5T, 7T y 9T detectadas por el ensayo CF-EU2v1 (solo mezcla A).
PET		Se incluyen marcadores STR hipervariables (rojos) en ambas mezclas. Esto permite la comparación entre la muestra amplificada con la mezcla mutante A y la muestra amplificada con la mezcla natural para reducir la posibilidad de confundir la muestra; un perfil STR diferente en cada una de las dos mezclas indica una confusión de muestras. La ausencia de estos marcadores STR indica una muestra fallida. La presencia de los marcadores STR a ufr muy bajas indica una muestra débil que debería analizarse con cuidado.
LIZ		En este canal se observarán fragmentos individuales de estándar de tamaño LIZ600v2.

M. QUIROZ  
BIOQUÍMICO - Mat. 7.335  
DIRECTOR TÉCNICO

## Sección 4: Guía de análisis del software GeneMapper

### Introducción

En la siguiente sección se describen los procedimientos para el análisis de muestras de los resultados del Elucigene CF-EU2v1 utilizando paquetes de software GeneMapper de Applied Biosystems (versión 3.7 o superior).

**Nota:** Los archivos GeneMapper v3.7 son compatibles hasta la v4.0, los archivos GeneMapper v5.0 son compatibles con la v4.1. Las capturas de pantalla de este documento se han tomado de GeneMapper v5.0.

Los archivos del producto GeneMapper v3.7 o v5.0 están disponibles en archivos zip descargables en el sitio web de Elucigene:

[www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/](http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/)

Para utilizar los productos de CF-EU2v1 los archivos zip contienen lo siguiente:

Configuración de análisis 3130	Configuración de análisis 3130	Configuración de análisis 3500
Archivo de panel	Archivo de panel	Archivo de panel
Archivo del bin	Archivo del bin	Archivo del bin
Configuración de plot	Configuración de plot	Configuración de plot
Configuración de tabla	Configuración de tabla	Configuración de tabla
Estándar de tamaño	Estándar de tamaño	Estándar de tamaño

En caso de cualquier dificultad, póngase en contacto con Asistencia técnica ([techsupport@elucigene.com](mailto:techsupport@elucigene.com)) para obtener asesoramiento.

## Importación de la configuración de GeneMapper

Es necesario importar la configuración del CF-EU2v1 para el GeneMapper. Este proceso se controla a través de la interfaz "GeneMapper Manager" (Administrador del GeneMapper).


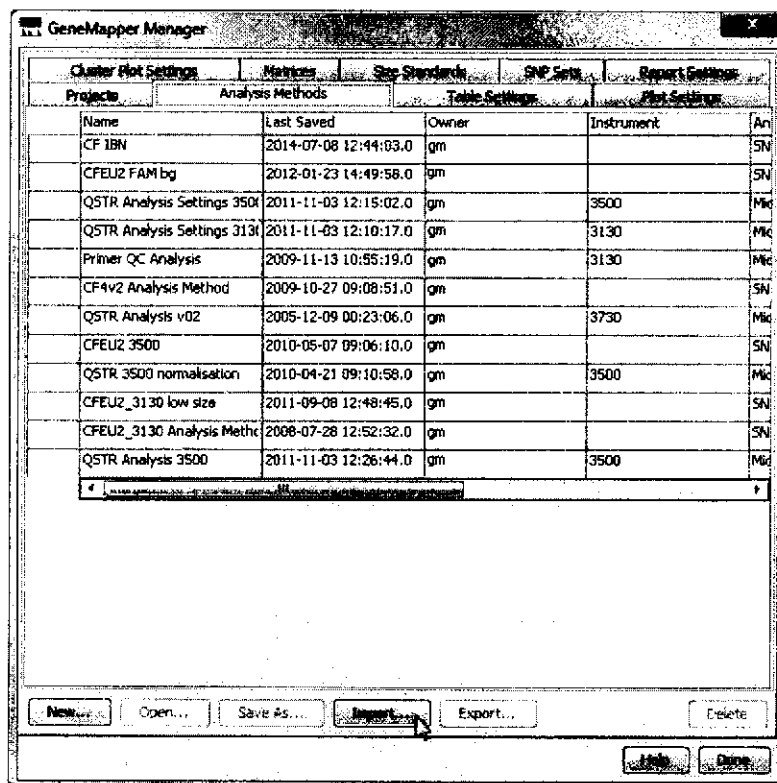
1. Abra el "GeneMapper Manager" (Administrador del GeneMapper) haciendo clic en el icono .
2. Seleccione la pestaña "Analysis Methods" (Métodos de análisis) y luego haga clic en el botón importar (consulte la Figura 6).

Figura 6: Interfaz del GeneMapper Manager




3. Vaya a los archivos de configuración necesarios para el análisis del producto CF-EU2v1 e impórtelos: 3130 o 3500.
4. Repita el proceso seleccionando la pestaña adecuada e importando el archivo correspondiente para lo siguiente:
  - Table Settings (Configuración de tabla)
  - Plot Settings (Configuración de plot)
  - Size Standards (Estándar de tamaño)

**Nota:** Cluster Plot Settings (Agrupar configuración de plot), Matrices, SNP Sets (Conjuntos de SNP) y Report Settings (Configuración de informe) no requieren importación de archivos.

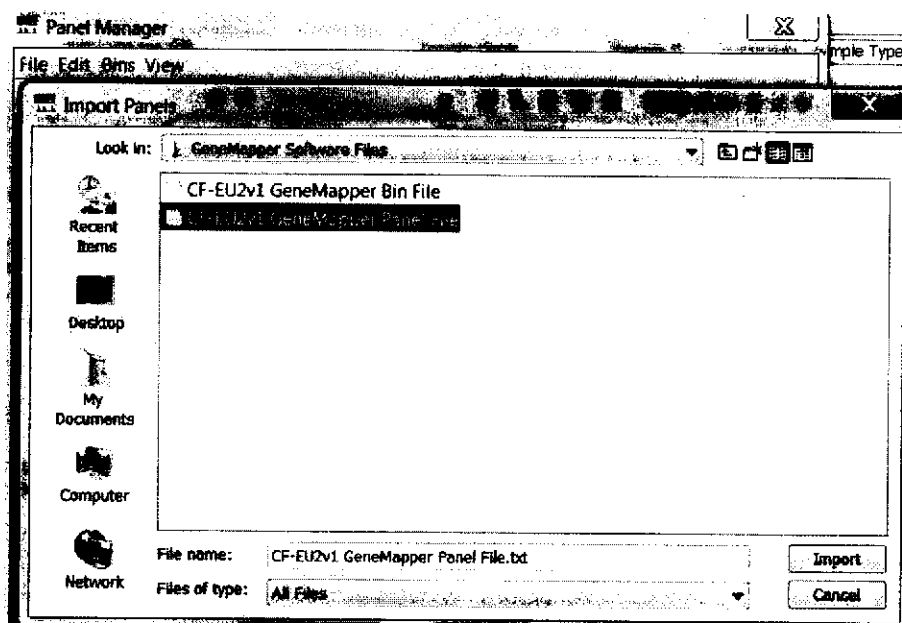


## Importación de archivos del bin y panel en el Panel Manager

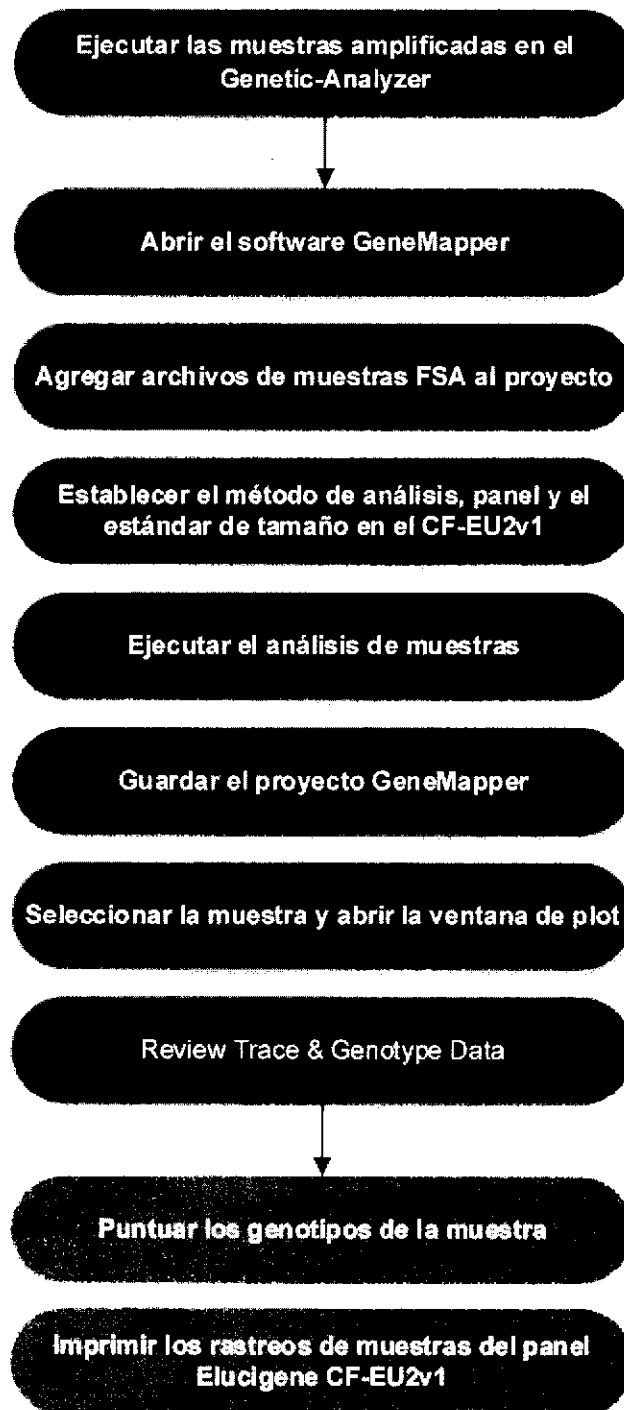
Es necesario importar la configuración del bin y panel de CF-EU2v1 para el GeneMapper. Este proceso se controla a través de la interfaz **"Panel Manager"** (Administrador del panel).

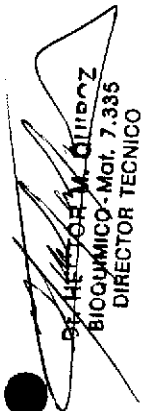
1. Abra el programa Panel Manager haciendo clic en el icono .
2. Haga clic en **"Panel Manager"** (Administrador del panel) en la ventana de navegación izquierda. El Panel Manager (Administrador del panel) aparecerá resaltado en color azul.
3. Seleccione **"File/Import Panels"** (Archivo/Importar paneles). Vaya al panel GeneMapper **"CF-EU2v1 GeneMapper Panel File.txt"** y proceda a importarlo (Figura 7).
4. El archivo de panel se visualizará ahora en la ventana de navegación izquierda. Haga clic en el archivo de panel asegurando que se resalte en color azul. Seleccione **"Import"** (Importar).
5. Seleccione **"File/Import Bin Set"** (Archivo/Importar conjunto de bins). Vaya al archivo bin GeneMapper **"CF-EU2v1 GeneMapper Panel File.txt"** y proceda a importarlo.
6. Haga clic en **"Apply"** (Aplicar) y luego en **"OK"**.

**Figura 7:** Importación del archivo de panel del ensayo CF-EU2v1



## Proceso de análisis



  
Dr. Hector M. Quiroz  
BIOQUÍMICO-Mat. 7.335  
DIRECTOR TÉCNICO

## Importación de archivos de datos sin procesar



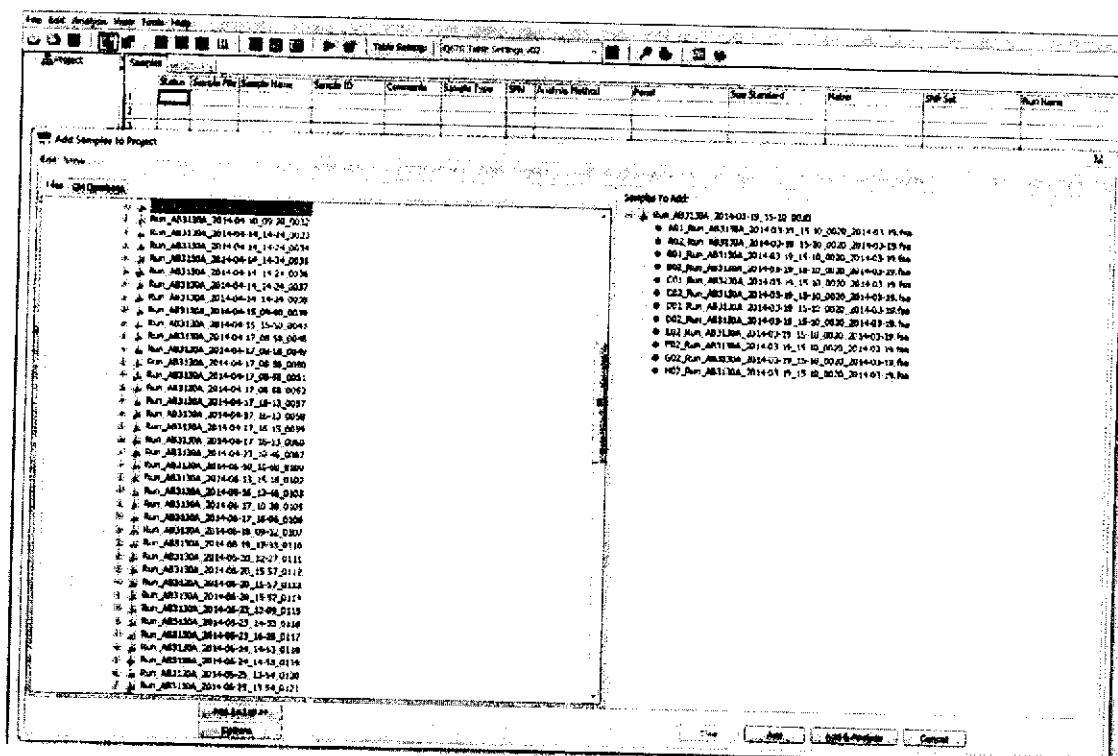
1. Abra el archivo del programa GeneMapper.
2. Haga clic en  para agregar archivos de datos a un proyecto nuevo. Vaya a donde están almacenados los archivos de datos sin procesar .fsa, resalte los archivos de datos pertinentes y haga clic en el botón "Add to List>>" (Agregar a lista).
3. La carpeta de ejecución aparecerá ahora en la ventana "Samples to Add" (Muestras que agregar). Al hacer doble clic en el icono de la carpeta de ejecución esta ventana mostrará cada archivo .fsa que se va a importar. Seguidamente se agregan muestras haciendo clic en  en la parte inferior de la pantalla. Los archivos de datos aparecerán ahora en la pantalla principal del GeneMapper (Figura 8).

Figura 8: Muestras listas para agregar al proyecto



## Análisis de archivos de datos sin procesar

- En la ventana principal GeneMapper seleccione "CFEU2 Table Settings" (Configuración de la tabla CFEU2) (Figura 9).

Figura 9: Ajuste de la configuración de la tabla

Status	Sample File	Sample Name	Type	SFN
	frag_001_A10.fsa	1A		1A
	frag_002_A10.fsa	1B		NA
	frag_003_B00.fsa	2A		NA
	frag_004_B10.fsa	2B		NA
	frag_005_C00.fsa	3A		NA
	frag_006_C10.fsa	3B	None	Sample
	frag_007_D00.fsa	4A	None	Sample
	frag_008_D10.fsa	4B	None	Sample

- En la ventana principal GeneMapper seleccione la primera celda en "Analysis Method" (Método de análisis) y seleccione el método de análisis adecuado en el menú desplegable: **método de análisis CFEU2 3130** o **CFEU2 3500**. Rellene las columnas pulsando "Ctrl+D". Repita este proceso seleccionando "CFEU2 Size Standard" (Estándar de tamaño CFEU2) en el encabezado "Size Standard" (Estándar de tamaño). Recuerde rellenar cada vez pulsando "Ctrl+D" para asegurarse de que se aplica cada ajuste a toda la lista de muestras.
- Seleccione el panel "CF-EU2v1" para cada muestra (Figura 10). Para la mezcla A seleccione el subpanel que contiene la mezcla A y para la mezcla B seleccione el subpanel que contiene la mezcla B.

Figura 10: Selección de la configuración del panel de CF-EU2v1

Sample Name	Comments	Sample Type	SFN	Analysis Method	Panel
1A	None	Sample	NA	CFEU2 3130 Analysis Method	CFEU2 A mix POP7
1B	None	Sample			CFEU2 B mix
2A	None	Sample			CFEU2 A mix POP7
2B	None	Sample			CFEU2 B mix
3A	None	Sample			CFEU2 A mix POP7
3B	None	Sample			CFEU2 B mix
4A	None	Sample			CFEU2 A mix POP7
4B	None	Sample			CFEU2 B mix
5A	None	Sample			CFEU2 A mix POP7
5B	None	Sample			CFEU2 B mix
6A	None	Sample			CFEU2 A mix POP7
6B	None	Sample			CFEU2 B mix
7A	None	Sample			CFEU2 A mix POP7
7B	None	Sample			CFEU2 B mix
8A	None	Sample			CFEU2 A mix POP7
8B	None	Sample			CFEU2 B mix

- Haga clic en para iniciar el análisis de la muestra. Asigne un nombre de proyecto cuando se le solicite.

## Revisión de datos del producto


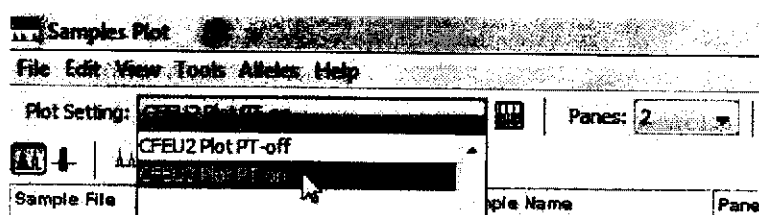
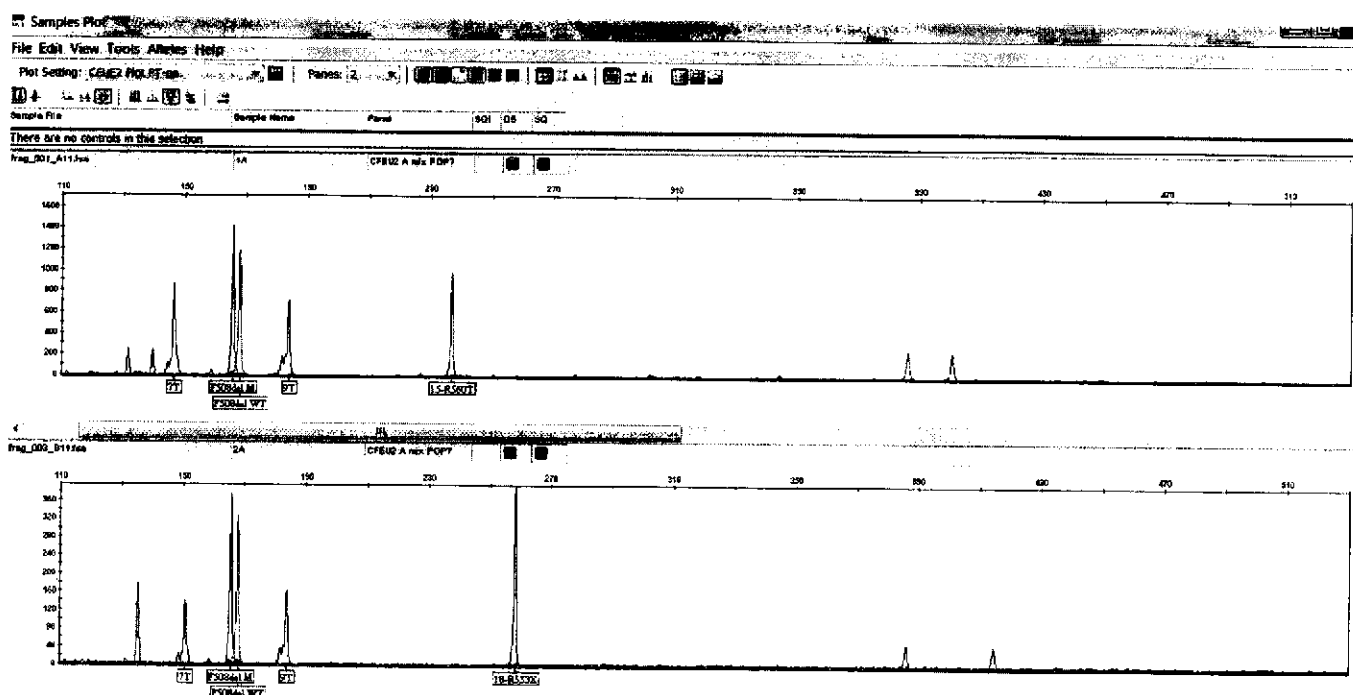
1. Seleccione la muestra para el análisis (resaltando la fila de muestras).
2. Haga clic en  para "Display Plots" (Visualizar plots).
3. Use el menú desplegable para seleccionar la configuración de plot CF-EU2v1 adecuada (Figura 11):
  - Para ver la mezcla A con datos poly-T seleccione: "CFEU2 Plot PT-on" (CFEU2 Plot PT activado)
  - Para ver la mezcla A sin datos poly-T seleccione: "CFEU2 Plot PT-off" (CFEU2 Plot PT desactivado)

Figura 11: Menú desplegable de la configuración de plot CF-EU2v1.



4. En la ventana del plot se visualizará el perfil de la muestra (Figura 12).
5. Se recomienda que la ventana del plot tenga activado "Single click editing" (Editar con un solo clic). Para hacer esto seleccione "Alleles/set click editing" (Alelos/ajustar edición con clic) y asegúrese de que esta opción esté marcada.

Figura 12: Ventana de plot de muestras con datos de rastreo etiquetados.



## Puntuación de los picos de diagnóstico

Cada individuo tiene dos copias del gen CFTR. Cuando estas copias tienen la misma secuencia en un determinado alelo, el individuo se describe como homocigoto respecto a ese alelo. Cuando las copias difieren en la secuencia en un determinado alelo, el individuo se describe como heterocigoto (Figura 14).

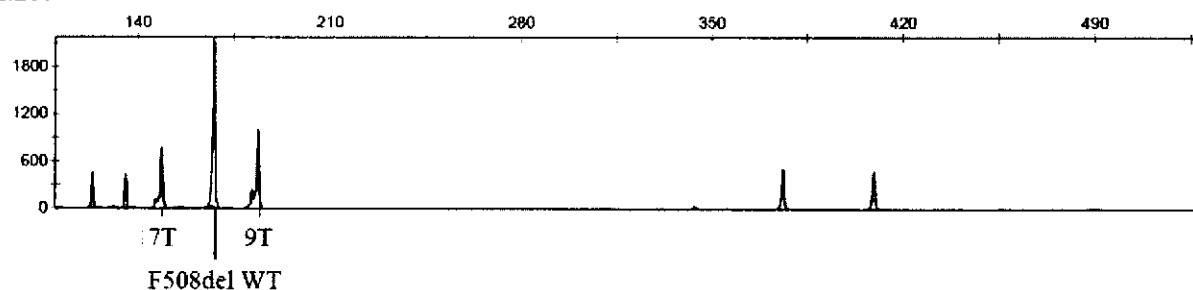
La mezcla A (mutante) determina si un individuo es portador de una mutación y esto viene indicado por la presencia de un pico azul. La mezcla mutante contiene también iniciadores del alelo F508del normal, por lo que esta mezcla puede determinar si un individuo es normal respecto a F508del (pico verde solamente), homocigoto respecto a F508del (pico azul solamente) o heterocigoto respecto a F508del (picos azul y verde).

Si se observa otra mutación, se puede amplificar la muestra con la mezcla B (natural) para determinar el estado de homocigoto o heterocigoto. La presencia de un pico verde para el alelo en cuestión en la mezcla natural indica que el individuo es heterocigoto y la ausencia de un pico verde indica que el individuo es homocigoto para la mutación en cuestión.

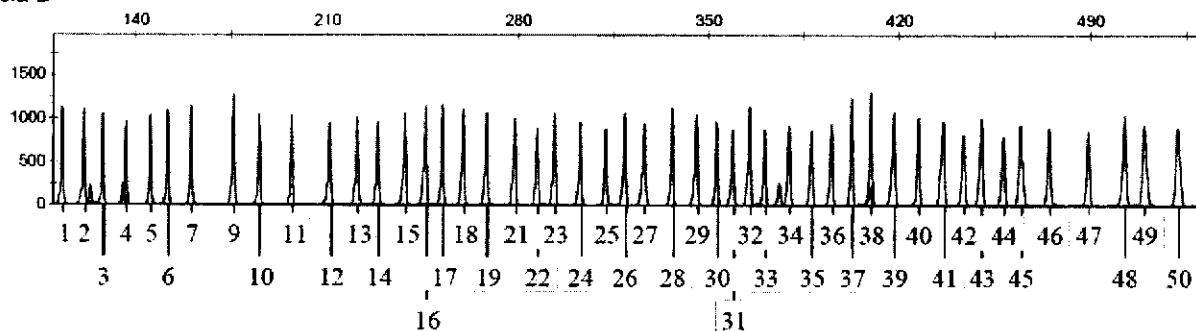
### Figura 13: Resultado natural

- En la mezcla A habrá un único pico verde (homocigoto F508del natural).
- En la mezcla B habrá un único pico verde (homocigoto natural).

Mezcla A



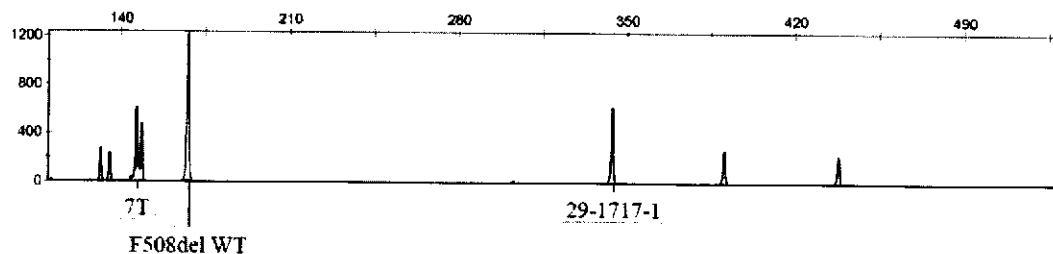
Mezcla B



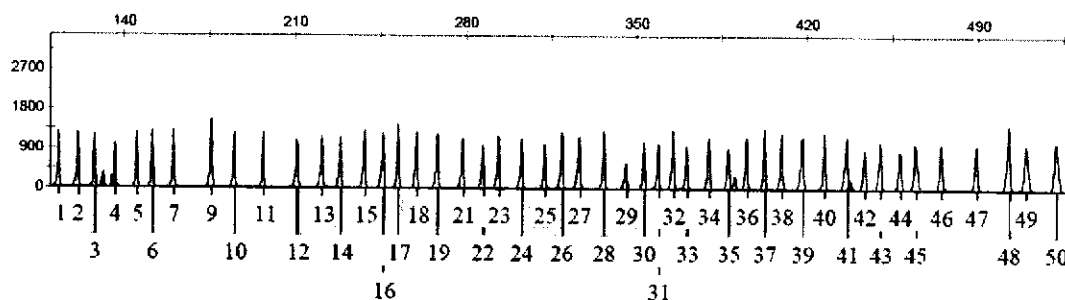
**Figura 14: Resultado heterocigoto**

- En la mezcla A habrá un único pico azul junto con el pico F508del del verde natural, lo que indica que el individuo es portador de una mutación.
- En la mezcla B habrá un único pico verde natural, de altura reducida, en la misma posición que en la mezcla A, lo que confirma el estado de heterocigoto.

Mezcla A



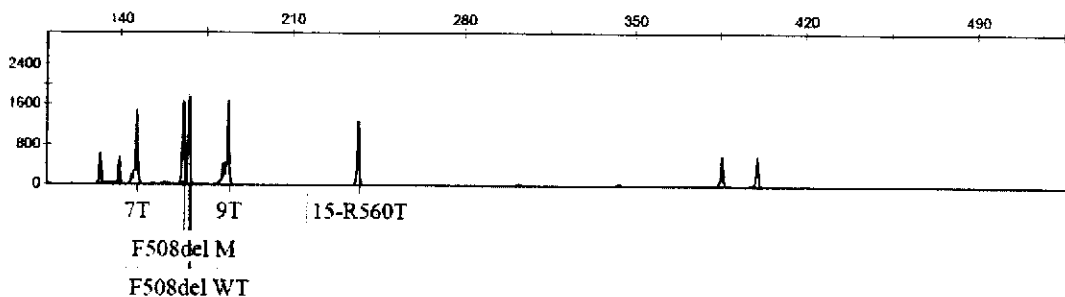
Mezcla B



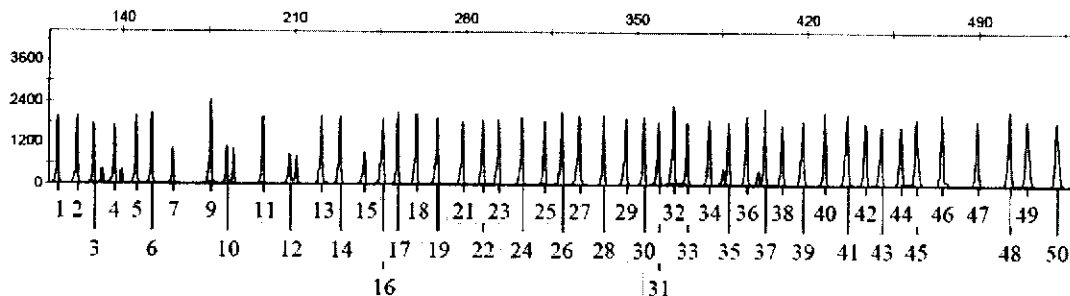
**Figura 15: Resultado heterocigoto F508del**

- En la mezcla A habrá un único pico verde y un único pico azul, de altura reducida.
- En la mezcla B se observará un pico I507del natural de altura reducida en la posición 5 y dos picos separados 3 pb en la posición 8 en los resultados de un individuo heterocigoto para F508del.

Mezcla A

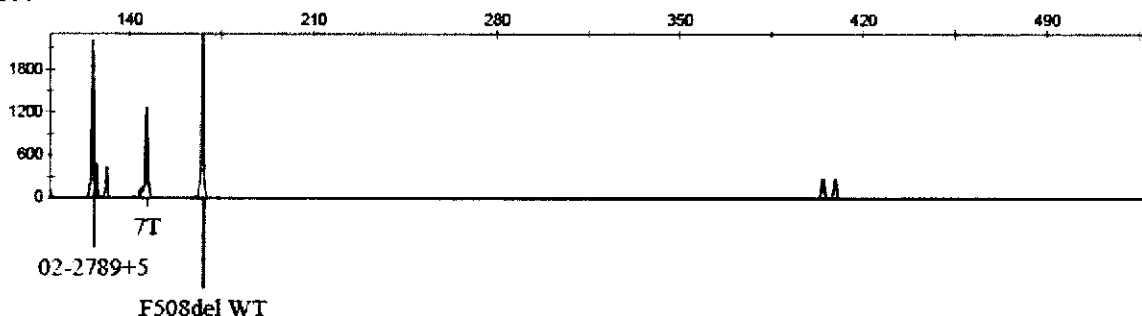
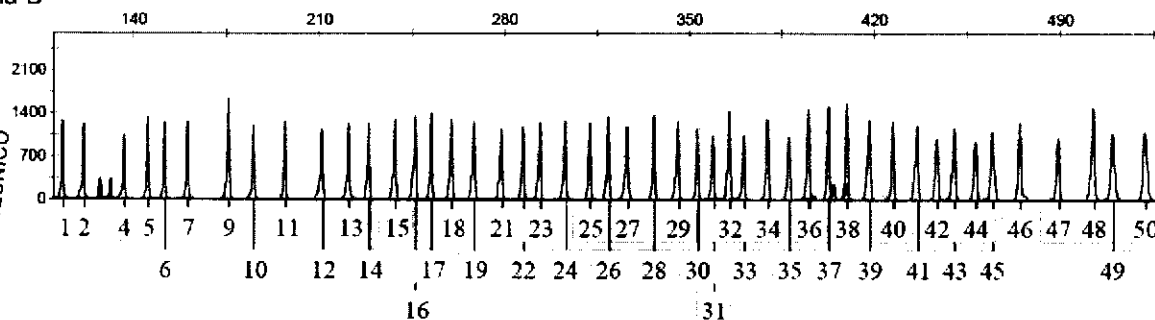


Mezcla B



**Figura 16: Resultado homocigoto**

- En la mezcla A habrá un único pico azul junto con el pico F508del verde natural, lo que indica que el individuo es portador de una mutación.
- En la mezcla B se observará la ausencia de un pico verde natural en la misma posición que en la mezcla A, lo que indica que el individuo es homocigoto para la mutación en particular.

**Mezcla A****Mezcla B**

**Nota:** En la guía de interpretación del producto pueden encontrarse ejemplos adicionales de los resultados que pueden obtenerse con el ensayo CF-EU2v1 (inserciones y deleciones anotadas, incluidas las deleciones I507 y F508). Dicha guía se encuentra disponible en el sitio web de Elucigene: [www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/](http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/).

**Nota:** El iniciador mutante G551D en la mezcla A detectará también la mutación S549RT>G. El software de análisis etiquetará esto como pico 20. No habrá un pico natural correspondiente en la mezcla B.

**Nota:** Para obtener una lista de marcadores detectados por el kit del CF-EU2v1 consulte la tabla resumen en el Anexo A. Los marcadores están ordenados de acuerdo con el rango de tamaño del producto RCP observado.

En caso de cualquier dificultad, póngase en contacto con Asistencia técnica ([techsupport@elucigene.com](mailto:techsupport@elucigene.com)) para obtener asesoramiento.

### Designación de marcadores de GeneMapper

Al visualizar datos de rastreo en GeneMapper, los picos de diagnóstico de la mezcla A se etiquetarán con el nombre y el número de marcador. Los picos de diagnóstico en la mezcla B solo se etiquetarán con el número de marcador.

Los datos de picos de un marcador detectado etiquetado pueden examinarse con más detalle pasando el cursor del ratón sobre la etiqueta del marcador de interés, tras lo cual en la ventana de plot de muestras aparecerán el nombre del marcador, y el tamaño y la altura del pico. Consulte el Anexo A para ver la tabla resumen de los rangos de tamaño individuales de los marcadores detectados por el ensayo CF-EU2v1.



## Modificación del archivo de parámetros de análisis

Puede ser necesario modificar los **"Analysis Ranges"** (Rangos de análisis) predeterminados en la configuración del análisis para tener en cuenta la variación local en las condiciones de ejecución. El rango de análisis mínimo dependerá de los capilares y polímeros que se utilicen durante la recogida de datos.

Para ver la configuración de análisis actual:


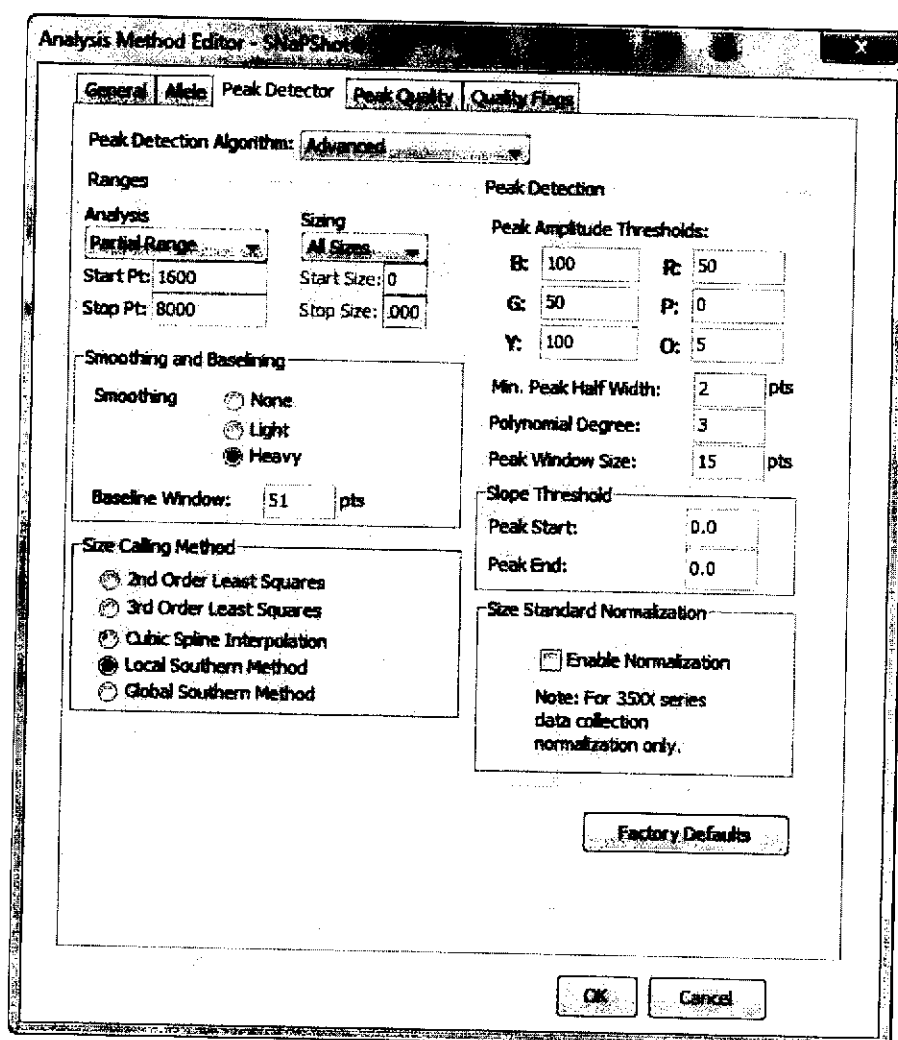
1. Abra el **"GeneMapper Manager"** (Administrador del GeneMapper) haciendo clic en el icono .
2. Seleccione la pestaña **"Analysis Methods"** (Métodos de análisis). El archivo importado CF-EU2v1 aparecerá como **"CFEU2 Analysis Method"** (Método de análisis CFEU2).
3. Haga clic en **"CFEU2 Analysis Method"** (Método de análisis CFEU2). La fila aparecerá ahora resaltada.
4. Haga clic en el botón **"Open"** (Abrir) y seleccione la pestaña **"Peak Detector"** (Detector de picos) (Figura 17). De forma predeterminada, los rangos de análisis están configurados para que empiecen en 1600 y acaben en 8000.

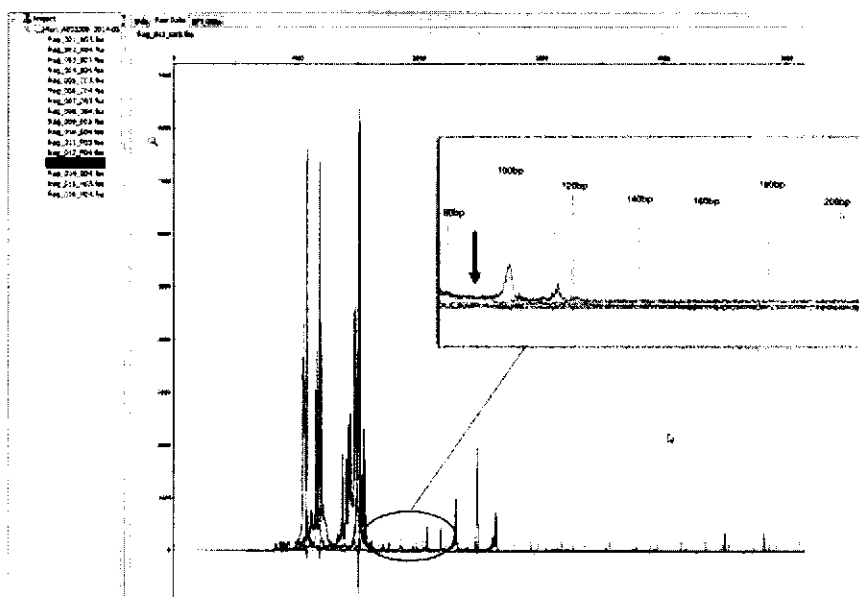
Figura 17: Rangos de análisis.



Para encontrar el rango de análisis correcto para su laboratorio:

5. Desde la ventana GeneMapper principal, haga doble clic en la Run Folder (Carpeta de ejecución) importada para ver la lista de archivos .fsa que contiene.
6. Seleccione un archivo .fsa.
7. Al hacer clic en la pestaña "Raw data" (Datos sin procesar) se visualizará el electroferograma de los datos sin procesar.
8. Usando el primer pico del estándar de tamaño (por ejemplo, 100bp para GS600v2 LIZ) a modo de guía, seleccione un punto de datos de aproximadamente 100 puntos de datos más corto (Figura 18). De este modo se determina el punto más bajo en el rango analizable.
9. Asegúrese de que el rango de análisis máximo abarca el mayor pico del estándar de tamaño (por ejemplo, 600 bp para GS600LIZv2).
10. Introduzca los valores nuevos en el archivo de análisis (obteniendo acceso al mismo como se describe más arriba).

**Figura 18:** Localización del rango mínimo utilizando datos de muestra sin procesar



**Nota:** En función de la concentración de la muestra, también puede ser necesario modificar los "Peak Amplitude Thresholds" (Umbral de amplitud de pico). Las muestras muy potentes tendrán un alto nivel de fondo que pueden interferir con el análisis. Para evitar esto, puede aumentarse el umbral de amplitud del pico. Por ejemplo, el colorante verde puede configurarse en 100 en lugar de 50. Para ello vaya a la pestaña "Peak Detector" (Detector de picos) en "CFEU2 Analysis Method" (Método de análisis CFEU2) (Figura 17).

## Sección 5: Guía de análisis del software GeneMarker

### Introducción

En la siguiente sección se describen los procedimientos para el análisis de muestras de los resultados del Elucigene CF-EU2v1 utilizando paquetes de software GeneMarker de SoftGenetics (versión 1.95 o superior).

**Nota:** Las capturas de pantalla de este documento se han tomado de GeneMarker v 2.6.3.

Los archivos del producto GeneMapper v1.95 o superior están disponibles en archivos zip descargables en el sitio web de Elucigene:

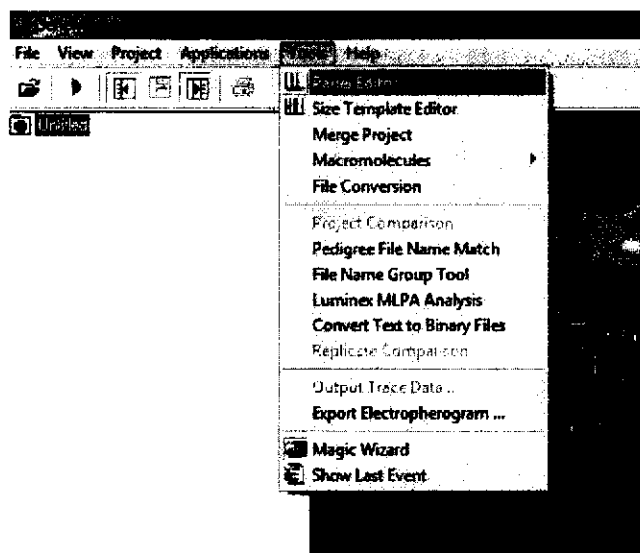
[www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/](http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/)

## Importación de la configuración del panel de GeneMarker del producto

Es necesario importar la configuración del panel CF-EU2v1 para el GeneMarker. Este proceso se controla a través de la interfaz "Panel Editor" (Editor del panel).

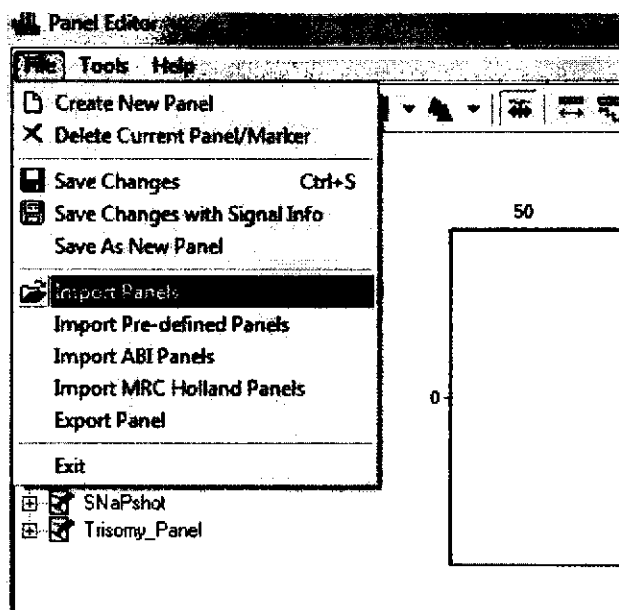
1. Abra el "Panel Editor" (Editor del panel) del menú desplegable "Tools" (Herramientas) (Figura 19).

Figura 19: Selección del Editor del panel



2. Seleccione "Import Panels" (Importar paneles) desde el menú desplegable "File" (Archivo) (Figura 20).

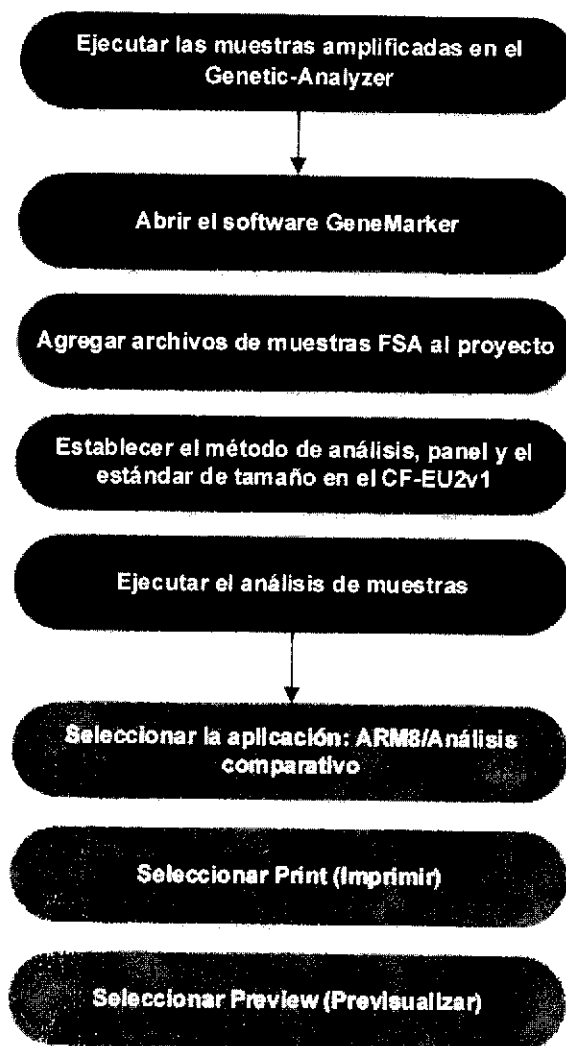
Figura 20: Importación de paneles



3. Vaya al archivo correspondiente del panel CF-EU2v1 e impórtelo.
4. Repita el proceso según proceda para otros archivos de paneles pertinentes.

## Proceso de análisis

El proceso de análisis de muestras se resume en el organigrama siguiente:

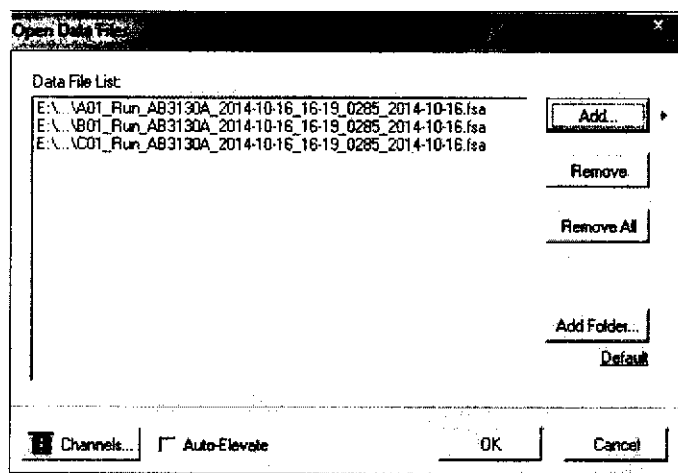


## Adición de archivos de muestras al GeneMarker

Abra el archivo del programa GeneMarker y seleccione **"Open Data"** (Abrir datos) cuando se le solicite. Aparecerá el cuadro Open Data Files (Abrir archivos de datos). Haga clic en el botón **"Add"** (Agregar). Aparecerá el diálogo Open (Abrir). Vaya al directorio que contiene los archivos de datos sin procesar:

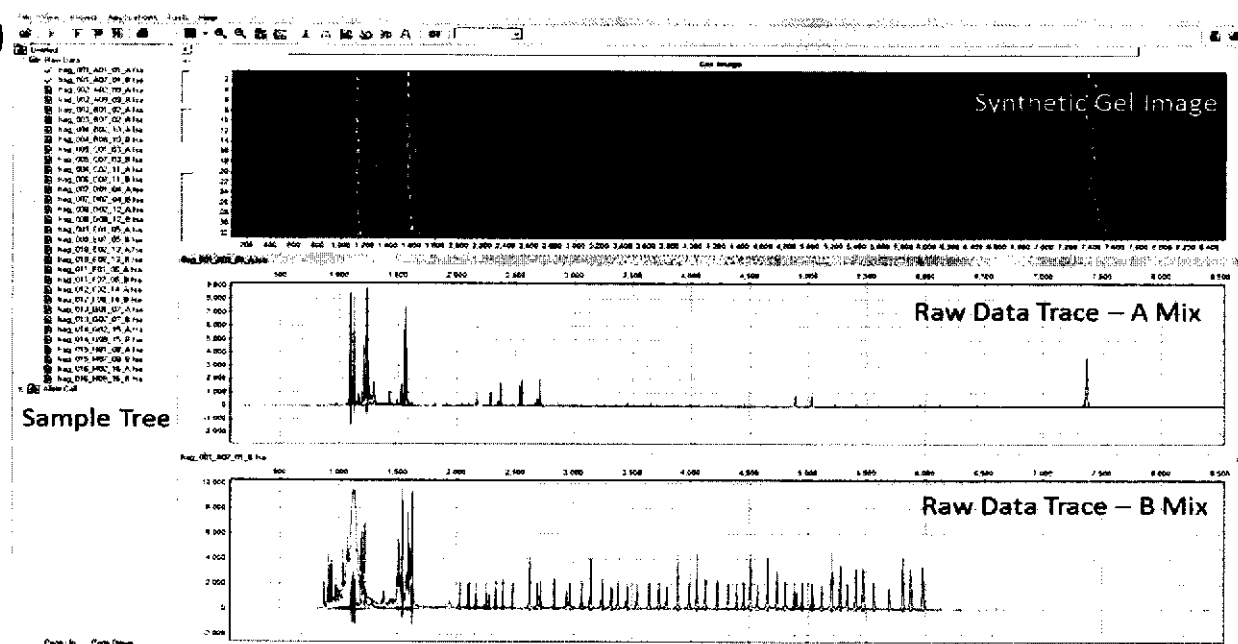
1. Seleccione todos los archivos mediante **CTRL+A** o use las teclas **CTRL** y/o **MAYÚS** para seleccionar muestras individuales.
2. Haga clic en el botón **"Open"** (Abrir) del diálogo Open (Abrir). Los archivos seleccionados aparecerán en el campo Data File List (Lista de archivos de datos) (Figura 21).

Figura 21: Muestras agregadas a la Lista de archivos de datos.



3. Haga clic en el botón **"OK"** en el cuadro Open Data Files (Abrir archivos de datos) y las muestras se cargarán en el GeneMarker. El software abrirá entonces automáticamente la ventana Raw Data Analysis (Análisis de datos sin procesar) (Figura 22).

Figura 22: Ventana de análisis de datos sin procesar



## Procesamiento de datos

Una vez cargados en el GeneMarker, los archivos de datos sin procesar estarán listos para su procesamiento. El paso de procesamiento incluye la aplicación de un estándar de tamaño, el filtrado de picos ruidosos y la comparación con un panel alélico conocido si se desea.

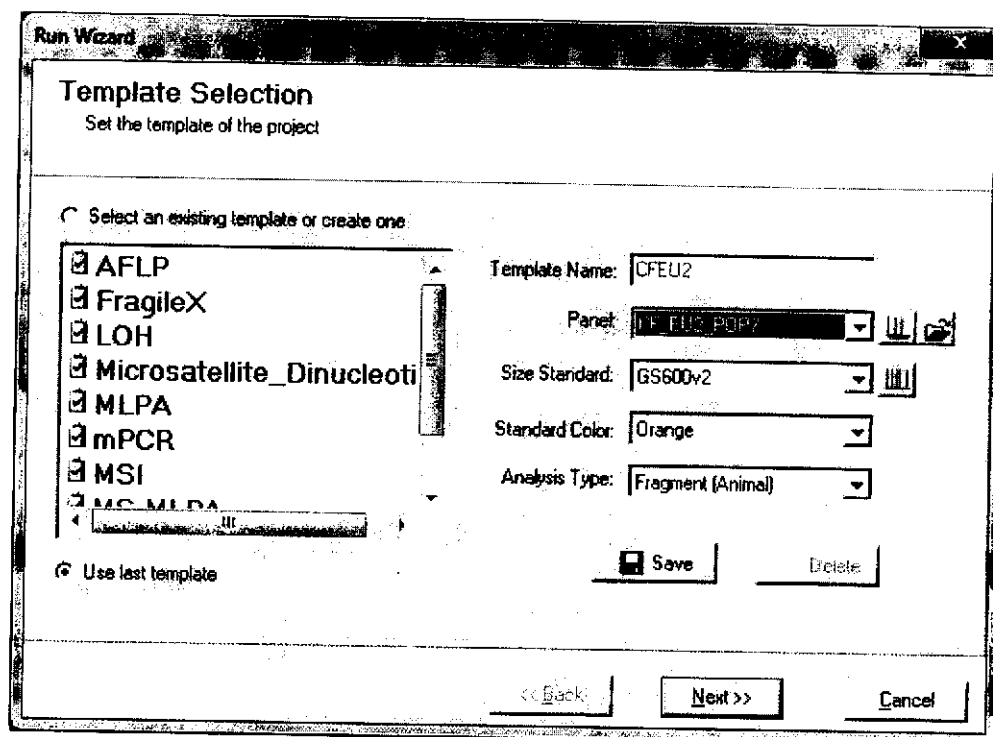
GeneMarker combina todos estos pasos en una sencilla herramienta llamada **"Run Wizard"** (Figura 23). Para acceder al Run Wizard (Asistente de ejecución) simplemente haga clic en el icono "Run Project" (Ejecutar proyecto) en la barra de herramientas principal.

### Run Wizard: creación de una plantilla de ejecución

Es necesario crear una plantilla de ejecución la primera vez que se utiliza este software para analizar los datos del CF-EU2v1. Esto se hace a través del Run Wizard:

1. Para acceder al Run Wizard simplemente haga clic en el icono **"Run Project"** (Ejecutar proyecto) en la barra de herramientas principal.
2. Asigne un nombre de plantilla, por ejemplo, CF-EU2v1.
3. Seleccione el Panel, Size Standard (Estándar de tamaño), Standard Colour (Color estándar) y Analysis Type (Tipo de análisis) como se muestra en la Figura 23 siguiente.
4. Haga clic en **"Save"** (Guardar) para guardar la plantilla para análisis futuros.
5. Haga clic en **"Next"** (Siguiente) para continuar.

**Figura 23:** Run Wizard: ventana de selección de plantilla



## Run Wizard: procesamiento de datos

La ventana Data Process (Procesamiento de datos) del Run Wizard permite al usuario seleccionar los parámetros de filtrado de picos.

1. Seleccione la configuración de análisis adecuada en la ventana Data Process (Procesamiento de datos) como se muestra en la figura siguiente (Figura 24).
2. Haga clic en "Next" (Siguiente) para continuar.

**Nota:** La configuración del rango de análisis dentro del arco de análisis de datos sin procesar variará dependiendo del polímero utilizado en la recogida de datos. El operador debe seleccionar un valor de punto de datos de inicio que incluya el pico del estándar de tamaño de 60 bp. Para datos 3500, aumente la intensidad mínima a 300.

Figura 24: Run Wizard: ventana de procesamiento de datos

## Run Wizard: configuraciones adicionales

No se requieren configuraciones adicionales (Figura 25). Haga clic en "OK" para continuar.

Figura 25: Run Wizard: configuraciones adicionales

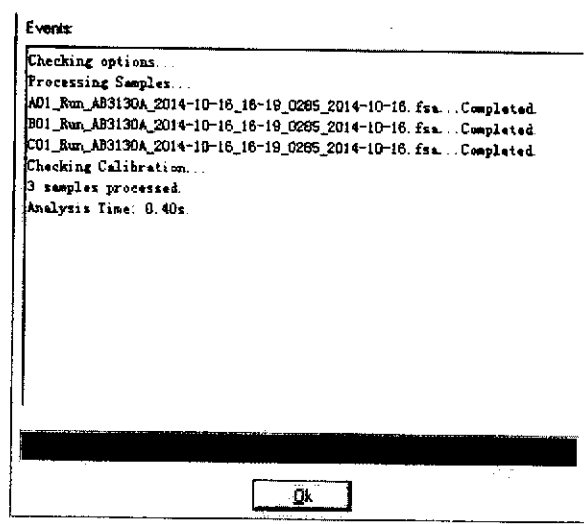


## Cuadro de procesamiento de datos

Después de hacer clic en "OK" en el cuadro Run Wizard Additional Settings (Configuraciones adicionales de Run Wizard), aparecerá el cuadro Data Processing (Procesamiento de datos) (Figura 26). Los datos sin procesar se procesan y dimensionan, tras lo cual se aplican los parámetros de filtrado y el panel seleccionado.

1. Haga clic en "OK" del cuadro Data Processing (Procesamiento de datos) cuando se complete el análisis.

**Figura 26:** Cuadro de procesamiento de datos



## Ventana de análisis principal

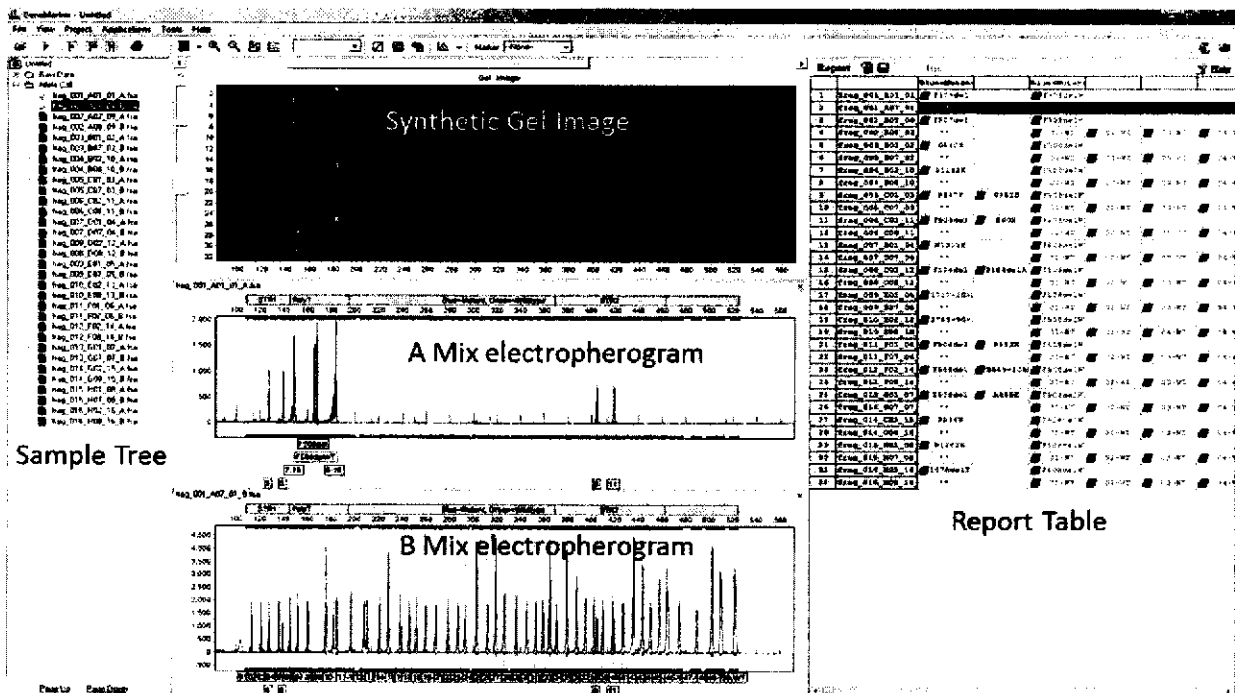
La disposición de la ventana de análisis principal (Figura 27) del GeneMarker es fácil de usar. Esta disposición incluye:

- La lista de archivos de muestras, que aparece en la parte izquierda de la ventana.
- La imagen de gel sintético, que aparece en la parte superior de la ventana.
- El electroferograma de datos, debajo de la imagen de gel.
- Una tabla de informes, que aparece en la parte derecha de la ventana.

En esta ventana es importante verificar que todos los picos apropiados en cada perfil se han decidido correctamente.

1. Haga doble clic en cada muestra por turno en el árbol de archivos de muestras situado en la parte izquierda de la pantalla. Haga clic derecho en cualquiera de los picos en cuestión y elija las opciones en el cuadro de diálogo, p. ej., editar o suprimir alelo, confirmar o anular según proceda.
2. Cuando no se puede descifrar el pico porque está por debajo del umbral, el alelo puede asignarse manualmente. Seleccione el "Marker" (Marcador) en el menú desplegable, y pulsando la tecla mayúscula haga clic con el botón derecho en el correspondiente pico, después haga clic en "Insert Allele" (Insertar alelo) y, por último, en "OK". Al analizar los datos de la mezcla A y B juntos es importante asegurarse de que se han descifrado todos los picos de STR.
3. Después de completar este proceso en todas las muestras, puede realizarse la siguiente fase del análisis.

Figura 27: Ventana de análisis principal

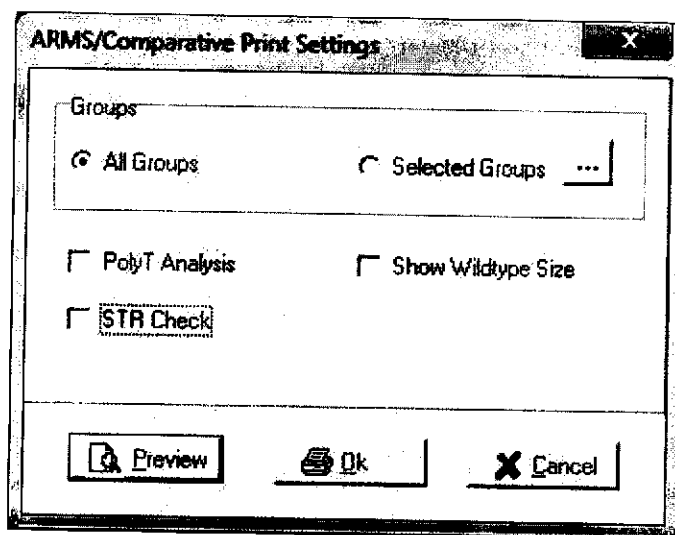


## Análisis y previsualización del informe de GeneMarker

### Informe de solo mutante (mezcla A)

1. En la ventana de análisis principal, seleccione la opción **"Applications"** (Aplicaciones) del menú desplegable situado en la parte superior de la pantalla.
2. Seleccione **"ARMS/Comparative Analysis"** (ARMS/Análisis comparativo) y después **"Mutant Only"** (Solo mutante). En el cuadro de diálogo **"ARMS/Comparative Print Settings"** (ARMS/Ajustes de impresión comparativos) seleccione **"Poly-T Analysis"** (Análisis poli-T) si es el análisis correspondiente (Figura 28).
3. Haga clic en **"Preview"** (Vista previa) en el cuadro de diálogo **"ARMS/Comparative Print Settings"** (ARMS/Ajustes de impresión comparativos) para ver el informe de solo mutante (mezcla A) de Elucigene CF-EU2v1 (Figura 29). En esta ventana el operador puede revisar e imprimir los informes de las muestras.
4. Haga clic en **"OK"** en el cuadro de diálogo **"ARMS/Comparative Print Settings"** (ARMS/Ajustes de impresión comparativos) para imprimir el informe de solo mutante (mezcla A) de Elucigene CF-EU2v1 (Figura 29) sin revisar.

Figura 28: Cuadro de ajustes de impresión comparativos/ARMS solo mutante



ARMS/Comparative Analysis Report - SoftGenetics

Sample: frag\_001\_A01\_01\_A.fsa

Software: GeneMarker V2.6.3      Analysis Type: ARMS/Comparative Analysis

Project: Unlabeled      Panel: CF\_EU2\_POP7

Operator:      Others: Chemistry: Lot #:

Exp Time: 10/12/2016 - 16:58:32 -> 10/12/2016 - 17:40:26      Report Time: 04/26/2017 - 11:57:43

STR1   PolyT   Blue-Mutant, Green-Wildtype   STR2

100   150   200   250   300   350   400   450   500

2,400  
2,200  
2,000  
1,800  
1,600  
1,400  
1,200  
1,000  
800  
600  
400  
200  
0  
-200

F508del  
F508delNT  
7-11   9-10

5) 8)      8) 11)

No.	Mutation	WildType	Mutant
1	8447P	0	0
2	8447P	0	0
3	2788-SG>A	0	0
4	3120-[G>T	0	0
5	711-TG>T	0	0
6	2834W	0	0
7	807del	0	0
8	F508del	0	0
9	3448-10bb>T	0	0
10	1677delTT	0	0
11	107delTT	0	0
12	Y62F	0	0
13	L205W	0	0
14	W128X	0	0
15	R560T	0	0
16	T247delC	0	0
17	G880X	0	0
18	R613X	0	0
19	G551D	0	0
20	S549N(T>G)	0	0
21	S549H	0	0
22	M1101K	0	0
23	G542X	0	0
24	S605del	0	0
25	Y1922(C>A)	0	0
26	S1251H	0	0
27	L444delA	0	0
28	R111-T88bA>G	0	0
29	T717-[G>A	0	0
30	R117H	0	0
31	R117C	0	0
32	N1303K	0	0
33	Y122X	0	0
34	394delTT	0	0
35	G85E	0	0
36	R1055C	0	0
37	1888-[G>A	0	0
38	W846X	0	0
39	T184delA	0	0
40	D1152H	0	0
41	Q717del2,3	0	0
42	P57I	0	0
43	T143delT	0	0
44	P80X	0	0
45	S655delP	0	0
46	R217-T88A>G	0	0
47	R217-G>T	0	0
48	A455E	0	0
49	R1165V	0	0
50	R1158X	0	0

Conclusion		
Comments:		
Date	Initial	
Authorization 1		
Authorization 2		

IVS 8	
Marker	Allele
PolyT	7-11
PolyT	9-10

El informe de GeneMarker incluye las características siguientes:

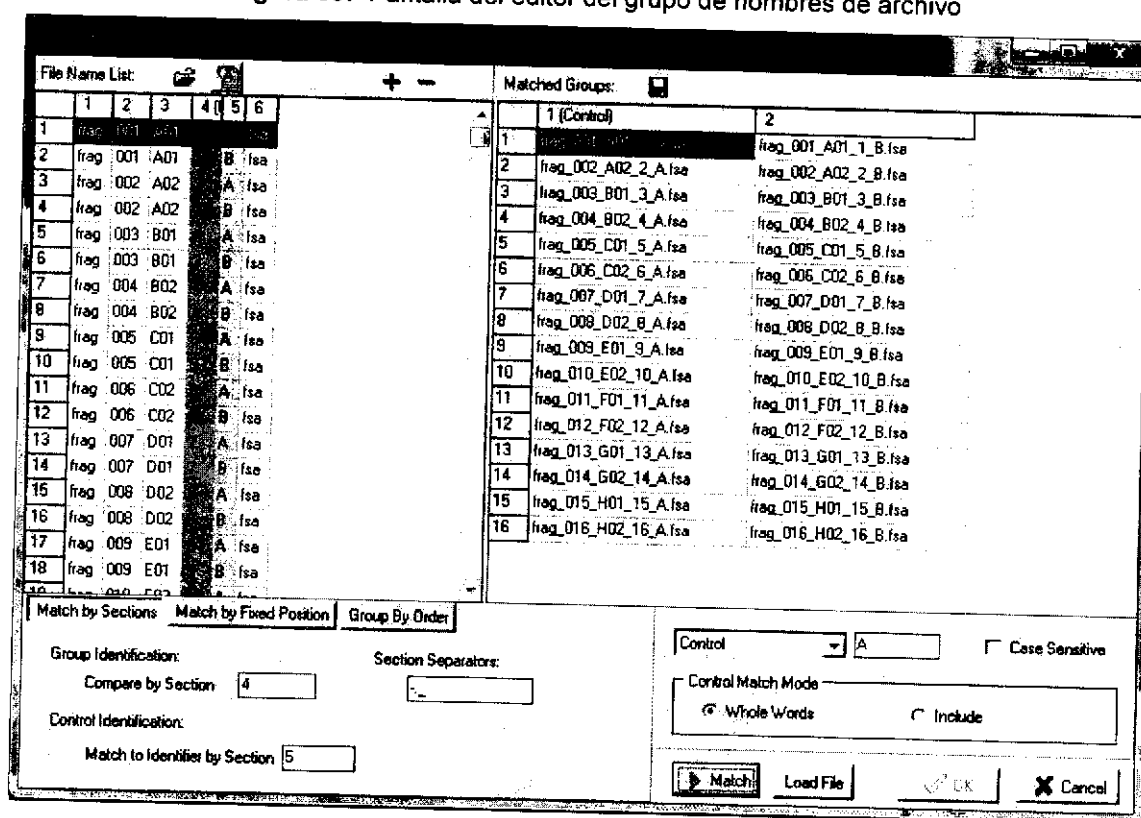
- Encabezado del informe: contiene información acerca del análisis, proyecto, muestra y parámetros.
- Cuadro para firma: fecha y espacio inicial de los revisores del informe.
- Electroferograma: similar a la ventana ARMS/Comparative analysis (ARMS/Análisis comparativo), muestra todos los tonos de colorante del trazo de muestra.
- Tabla del informe: en la tabla principal se muestran todas las mutaciones analizadas en este kit. La presencia o ausencia de una mutación se indica con 1 o 0. Téngase en cuenta que el estado total de cigoticidad solo puede notificarse para el locus F508 cuando solo se analiza la mezcla A. En la segunda tabla se muestra el estado de poli-T de la muestra si se ha seleccionado la función.

## Análisis y previsualización del informe de GeneMarker

### Mezcla (A y B) mutante y natural

- En la ventana de análisis principal, seleccione la opción **"Tools"** (Herramientas) del menú desplegable situado en la parte superior de la pantalla y, después, el **"File Name Group Tool"** (Herramienta para grupo de nombres de archivo). Se abrirá la pantalla **"File Name Group Tool"** (Herramienta para grupo de nombres de archivo). En el cuadro **"Compare by Section"** (Comparar por sección) escriba el número de la columna en la que aparece el nombre de la muestra. En el cuadro **"Match to Identifier by Section"** (Hacer coincidir con el identificador por sección) escriba el número de la columna en la que aparece el tipo de mezcla, es decir, A o B. En el cuadro **"Control Identifier"** (Identificador de control) escriba "A". Haga clic en el botón **"Match"** (Hacer coincidir) y las muestras coincidentes aparecerán en el lateral derecho del cuadro de diálogo (Figura 30).

Figura 30: Pantalla del editor del grupo de nombres de archivo



- Guarde el grupo coincidente en la correspondiente carpeta haciendo clic en el icono situado en la parte superior de la sección **"Matched Groups"** (Grupos coincidentes).
- En la ventana de análisis principal, seleccione la opción **"Applications"** (Aplicaciones) del menú desplegable situado en la parte superior de la pantalla.
- Seleccione **"ARMS/Comparative Analysis"** (ARMS/Análisis comparativo) seguido de **"Mutant + Wildtype"** (Mutante + Natural). En el cuadro de diálogo **"ARMS/Comparative Analysis"** (ARMS/Análisis comparativo) seleccione el **"Group File"** (Archivo de grupos) pertinente y después seleccione **"Poly-T Analysis"** (Análisis de poli-T) si este análisis es el correspondiente y/o **"STR Check"** (Comprobación de STR) (Figura 31). Haga clic en **"OK"** para ver la ventana **"ARMS/Comparative Analysis"** (ARMS/Análisis comparativo) (Figura 32).

Figura 31: Cuadro de configuración de ARMS/Análisis comparativo

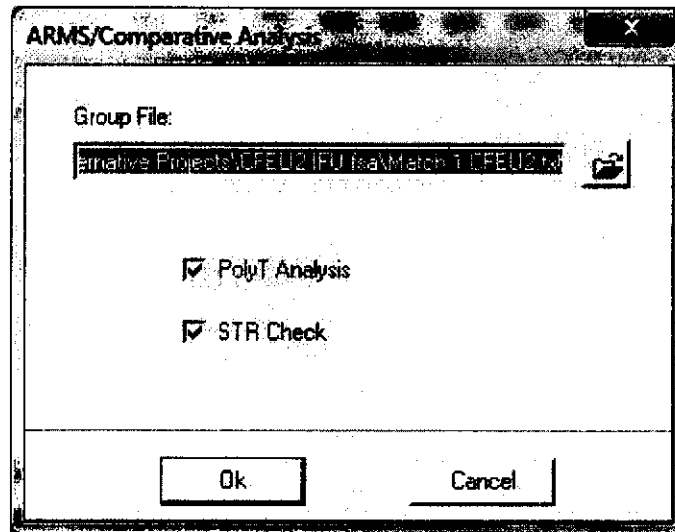
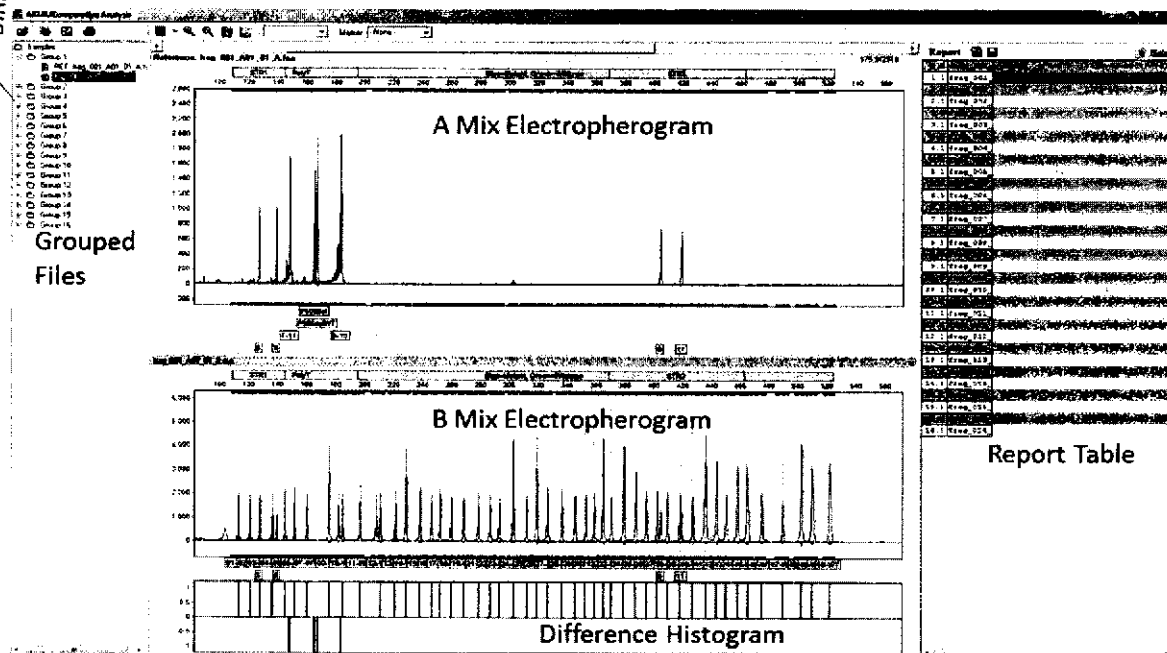
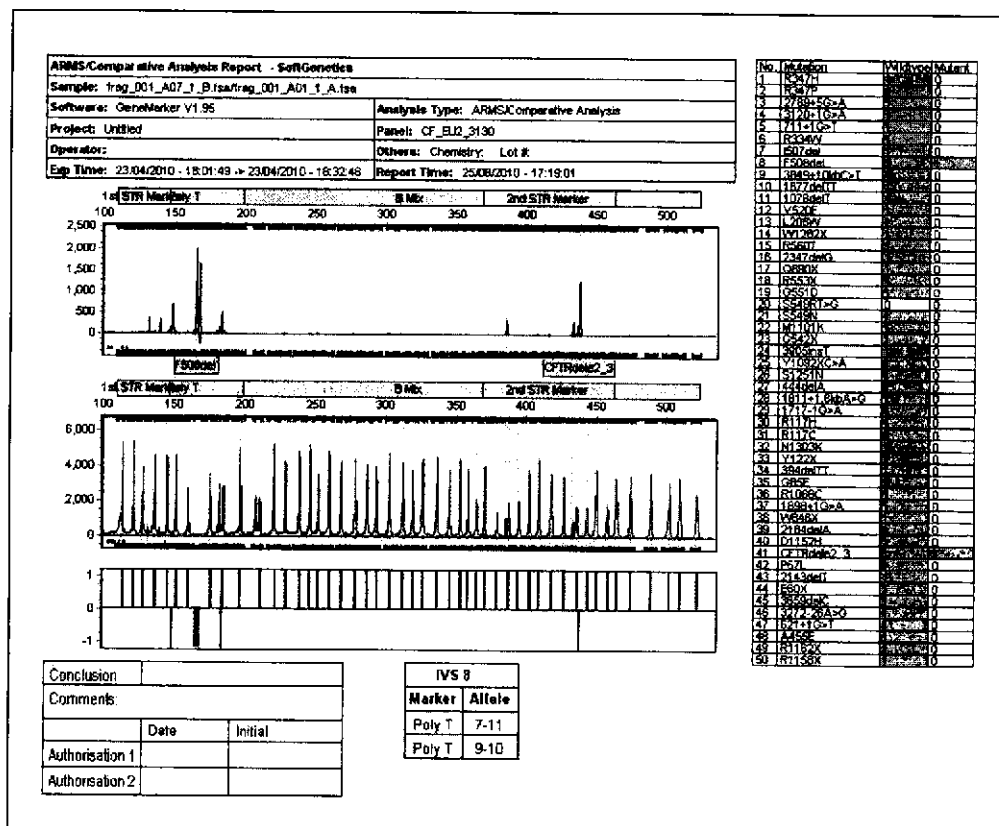


Figura 32: Ventana ARMS/Análisis comparativo



5. Haga clic en el icono de impresión en la ventana "ARMS/Comparative Analysis" (ARMS/Análisis comparativo). Seleccione "Poly-T Analysis" (Análisis de poli-T) si este análisis es el correspondiente y/o "STR Check" (Comprobación de STR) (Figura 31). "Preview" (Vista previa) para ver el informe de Elucigene CF-EU2v1 A + B (Figura 33). En esta ventana el operador puede revisar e imprimir los informes de las muestras.

Figura 33: Ventana del informe de CF-EU2v1 Mutante + Natural (mezcla A + B)



El informe de Elucigene CF-EU2v1 incluye las características siguientes:

- Encabezado del informe: contiene información acerca del análisis, proyecto, muestra y parámetros.
- Cuadro para la firma: fecha y espacio inicial de los revisores del informe. Se incluye una columna más para las iniciales del revisor.
- Electroferograma: similar a la ventana de ARMS/Análisis comparativo, muestra todos los tonos de colorante del trazo de muestra.
- Tabla del informe: en la tabla principal se muestran todas las mutaciones analizadas en este kit. El estado homocigoto o heterocigoto se indica mediante el número de alelos naturales o mutantes notificados en cada locus. En la segunda tabla se muestra el estado de poli-T de la muestra si se ha seleccionado la función.
- Histograma de comparación de rastreo: GeneMarker calcula las diferencias alélicas entre el rastreo de mezcla A y B, y las muestra en el histograma situado debajo de los electroferogramas de muestras.

## Etiquetas de los picos

Las etiquetas de los picos se muestran con códigos de color según la calidad de la coincidencia entre el pico detectado y los bins del panel observados. En el electroferograma, los marcadores son barras grises horizontales y el centro de los picos está marcado con una barra gris vertical.

Los picos que caen fuera de los marcadores o de los bins del panel se marcan en rojo como Fuera de escala (OL, Off Ladder).

**Nota:** Las varianzas en el tipo de polímero y el estándar de tamaño del aparato podrían requerir la optimización de los bins de los marcadores para adaptar el software a las condiciones de ejecución que se estén utilizando. Puede encontrarse más información sobre cómo modificar los bins del panel en el Manual del GeneMarker suministrado con el software.

## Puntuación de los picos de diagnóstico

Cada individuo tiene dos copias del gen CFTR. Cuando estas copias tienen la misma secuencia en un determinado alelo, el individuo se describe como homocigoto respecto a ese alelo. Cuando las copias difieren en la secuencia en un determinado alelo, el individuo se describe como heterocigoto.

La mezcla A (mutante) determina si un individuo es portador de una mutación y esto viene indicado por la presencia de un pico azul. La mezcla mutante contiene también iniciadores del alelo F508del normal, por lo que esta mezcla puede determinar si un individuo es normal respecto a F508del (pico verde solamente), homocigoto respecto a F508del (pico azul solamente) o heterocigoto respecto a F508del (picos azul y verde).

Si se observa otra mutación, se puede amplificar la muestra con la mezcla B (natural) para determinar el estado de homocigoto o heterocigoto. La presencia de un pico verde para el alelo en cuestión en la mezcla natural indica que el individuo es heterocigoto y la ausencia de un pico verde indica que el individuo es homocigoto para la mutación en cuestión.

Consulte la Figura 34 para ver ejemplos de GeneMarker

**Nota:** En la guía de interpretación del producto pueden encontrarse ejemplos adicionales de los resultados que pueden obtenerse con el ensayo CF-EU2v1 (inserciones y deletiones anotadas, incluidas las deletiones 1507 y F508). Dicha guía se encuentra disponible en el sitio web de Elucigene: [www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/](http://www.elucigene.com/product-category/cystic-fibrosis/)

**Nota:** El iniciador mutante G551D en la mezcla A detectará también la mutación S549RT>G. El software de análisis etiquetará esto como pico 20. No habrá un pico natural correspondiente en la mezcla B.

**Nota:** Para obtener una lista de marcadores detectados por la mezcla del CF-EU2v1 consulte la tabla resumen en el Anexo A. Los marcadores están ordenados de acuerdo con el rango de tamaño del producto RCP observado.

En caso de cualquier dificultad, póngase en contacto con Asistencia técnica ([techsupport@elucigene.com](mailto:techsupport@elucigene.com)) para obtener asesoramiento.

## Designación de marcadores de GeneMarker

Al visualizar datos de rastreo en GeneMarker, los picos de diagnóstico de la mezcla A se etiquetarán con el nombre y el número de marcador. Los picos de diagnóstico en la mezcla B solo se etiquetarán con el número de marcador.

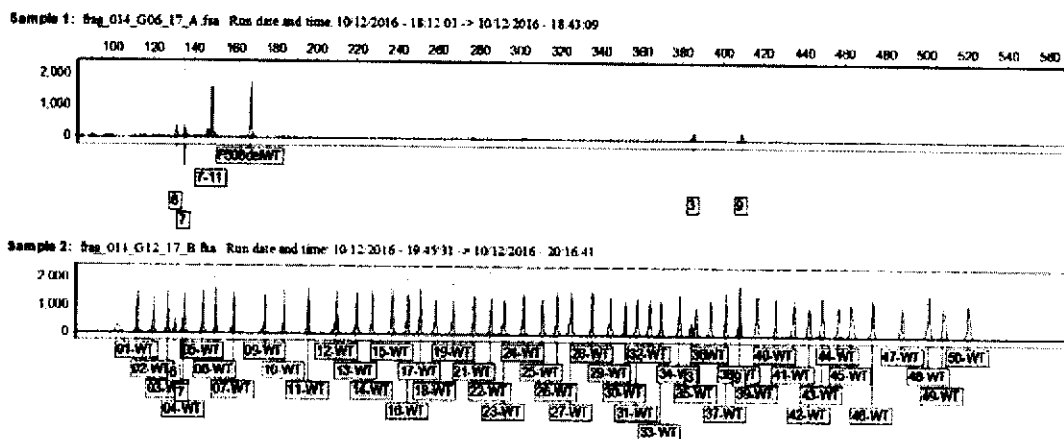
Los datos de picos de un marcador detectado etiquetado pueden examinarse con más detalle pasando el cursor del ratón sobre la etiqueta del marcador de interés, tras lo cual en la ventana de plot de muestras aparecerán el nombre del marcador, y el tamaño y la altura del pico.

Consulte el **Anexo A** para ver la tabla resumen de los rangos de tamaño individuales de los marcadores detectados por el ensayo CF-EU2v1.

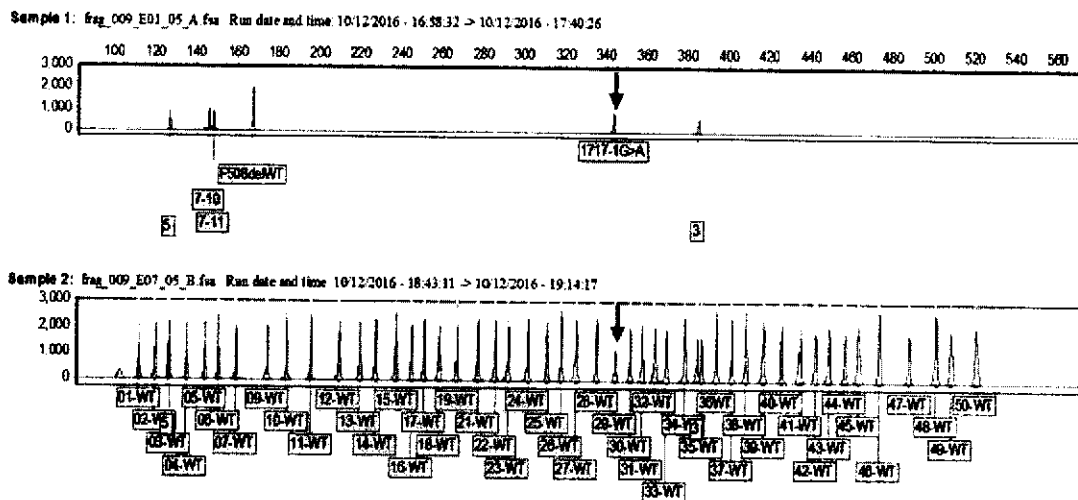


**Figura 34:** Ejemplos de representaciones a) normales, b) heterocigotas y c) homocigotas

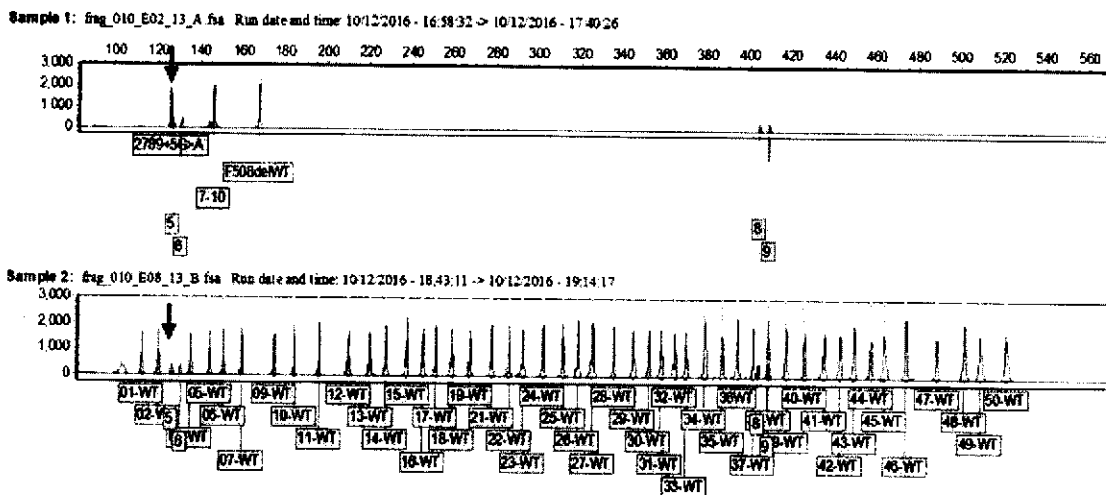
**A. Normales**

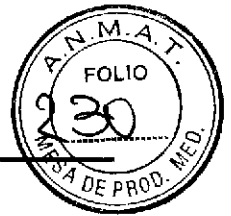


**B. Heterocigotas (1717-1G>A mutación)**



**C. Homocigotas (2789+5G>A mutación)**





## Sección 6: Rendimiento del ensayo

### Descripción

Se realizaron estudios clínicos para determinar el rendimiento de las características del ensayo CF-EU2v1. Todos los estudios de validación se realizaron en los analizadores genéticos 3130xl y 3500 con los materiales, equipo y procedimientos descritos en el documento de Instrucciones de uso.

Todas las muestras usadas para la validación se han caracterizado previamente mediante secuenciación bidireccional (criterio de referencia).

### Precisión: características de rendimiento

#### Validación interna

##### Introducción y protocolo

La precisión del ensayo CF-EU2v1 se valoró mediante la evaluación de 159 muestras representativas de una amplia selección de variantes de CFTR procedentes de cuatro fuentes independientes. Las muestras estaban compuestas por lo siguiente: 91 muestras de gDNA clínicas anonimizadas aisladas de sangre humana, 21 muestras derivadas de manchas de sangre, gDNA obtenido de 37 muestras de líneas celulares de un proveedor comercial, y 10 objetivos sintéticos. La precisión de las lecturas de todas las muestras se comparó con la secuenciación bidireccional.

La precisión del ensayo CF-EU2v1 para detectar variantes de poly-TG/poly-T se valoró mediante la evaluación de 148 muestras procedentes de tres fuentes independientes. El conjunto de las muestras contenía ejemplos de cada variante de poly-T solicitados por el ensayo (según el uso indicado). Las muestras estaban compuestas por lo siguiente: 90 muestras de gDNA clínicas anonimizadas aisladas de sangre humana, 21 muestras derivadas de manchas de sangre, gDNA obtenido de 37 muestras de líneas celulares de un proveedor comercial. La precisión de las lecturas de todas las muestras se comparó con la secuenciación bidireccional.

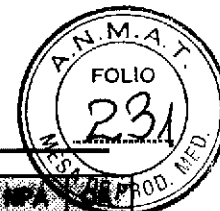
##### Resultados de las pruebas y conclusiones

La precisión se notifica como concordancia de porcentaje positivo (PPA), concordancia de porcentaje negativo (NPA) y concordancia general (OA). Los resultados finales de precisión del ensayo basados en todos los resultados se indican en las Tablas 6a y 6b siguientes:

Dr. HECTOR M. QUIROGA  
BIOQUÍMICO - Mat. 7.338  
DIRECTOR TÉCNICO

Tabla 6a: Precisión del ensayo CF-EU2v1 (por mutación)

Mutación (nombre común)	Lecturas totales	Lecturas positivas (mutaciones)			Lecturas negativas (no mutaciones)	N.º de lecturas erróneas	N.º sin lecturas	PPA (%)	NPA (%)	OA (%)
		Mutaciones clínicas	Mutaciones de riesgo relacionadas	Mutaciones asintomáticas						
CFTRdele2,3	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
E60X	159	1	1	0	157	0	0	100	100	100
P67L	159	1	0	1	157	0	0	100	100	100
G85E	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
394delTT	159	1	1	0	157	0	0	100	100	100
444delA	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
R117C	159	2	0	1	156	0	0	100	100	100
R117H	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
Y122X	159	1	1	0	157	0	0	100	100	100
621+1G>T	159	1	2	0	156	0	0	100	100	100
711+1G>T	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
L206W	159	0	0	1	158	0	0	100	100	100
1078delT	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
R334W	159	1	1	0	157	0	0	100	100	100
R347P	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
R347H	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
A455E	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
I507del	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
F508del	159	34	11	1	113	0	0	100	100	100
1677delTA	159	1	0	1	157	0	0	100	100	100
V520F	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
1717-1G>A	159	3	1	0	155	0	0	100	100	100
G542X	159	6	1	0	152	0	0	100	100	100
S549R(T>G)	159	1	1	0	157	0	0	100	100	100
S549N	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
G551D	159	4	1	0	154	0	0	100	100	100
R553X	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
R560T	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
1811+1.6kbA>G	159	1	0	1	157	0	0	100	100	100
1898+1G>A	159	1	1	0	157	0	0	100	100	100
2143delT	159	1	0	0	158	0	0	100	100	100
2184delA	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
2347delG	159	1	0	1	157	0	0	100	100	100
W846X	159	1	0	1	157	0	0	100	100	100
2789+5G>A	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
Q890X	159	0	0	1	158	0	0	100	100	100
3120+1G>A	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
3272-26A>G	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
R1066C	159	2	0	1	156	0	0	100	100	100
Y1092X(C>A)	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
M1101K	159	0	1	0	158	0	0	100	100	100
D1152H	159	6	1	0	152	0	0	100	100	100
R1158X	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
R1162X	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
3659delC	159	2	1	0	156	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	159	3	1	0	155	0	0	100	100	100



Mutación (nombre común)	Lecturas totales	Lecturas positivas (mutación)			Lecturas negativas (no mutación)	N.º de lecturas erróneas	N.º sin lecturas	PPA (%)	NPA (%)	DA (%)
		Muestras clínicas	Muestra de líneas celulares	Muestras similares						
S1251N	159	1	0	1	157	0	0	100	100	100
3905insT	159	1	1	0	157	0	0	100	100	100
W1282X	159	12	1	0	146	0	0	100	100	100
N1303K	159	5	1	0	153	0	0	100	100	100
WT	14	0	0	0	14	0	0	100	100	100
TOTAL	7964	114	50	11	7789	0	0	100	100	100

Tabla 6b: Precisión del ensayo CF-EU2v1 (por variantes de poly-TG/poly-T)

Genotipo	Muestras clínicas	Muestra de líneas celulares	N.º de lecturas erróneas	N.º sin lecturas	PPA (%)	NPA (%)	DA (%)
(TG)11(T)5/(T)7	3	0	0	0	100	100	100
(TG)11(T)5/(T)9	3	0	0	0	100	100	100
(TG)12(T)5/(T)7	6	1	0	0	100	100	100
(TG)12(T)5/(T)9	3	1	0	0	100	100	100
(T)7/(T)7	50	17	0	0	100	100	100
(T)7/(T)9	35	16	0	0	100	100	100
(T)9/(T)9	12	2	0	0	100	100	100

HEctor M. Quiroz  
 Bioquímico - Mat. 7.335  
 DIRECTOR TECNICO

## Precisión: repetibilidad

### Introducción y protocolo

El objetivo de este estudio era demostrar que el ensayo CF-EU2v1 produce resultados repetibles si se analizan en idénticas condiciones, en tres ocasiones distintas el mismo día y con un lote de un solo fabricante. Se preparó un panel de referencia de muestras de ADN (formado por analitos adecuados y un control negativo).

Para la primera configuración experimental cada muestra de ADN se analizó 4 veces (4 repeticiones) con el protocolo de RPC adecuado como se indica en las Instrucciones de uso. Los productos RCP etiquetados fluorescentemente se separaron mediante electroforesis capilar. El análisis posterior se realizó con el software GeneMapper 5.

Este experimento se repitió dos veces más durante un periodo de 24 horas.

### Resultados de las pruebas y conclusiones

Para cada repetición analizada en las tres ocasiones distintas, todos los marcadores previstos estaban presentes y dieron como resultado la interpretación del diagnóstico correcto en cada una de las muestras del panel de ADN. La repetibilidad se notifica como concordancia de porcentaje positivo (PPA), concordancia de porcentaje negativo (NPA) y concordancia general (OA). Los resultados del estudio de repetibilidad, visualizados por muestras, se incluyen en la Tabla 7 siguiente. Estos datos proporcionan pruebas de que el ensayo CF-EU2v1 produce resultados repetibles de forma sistemática.

Tabla 7: Repetibilidad del ensayo CF-EU2v1 (por muestra)

N.º de muestra	Mutaciones presentes	Lecturas concordantes positivas (picos de mutación)			Lecturas concordantes negativas (picos naturales)			N.º de lecturas erróneas	N.º sin lecturas	PPA (%)	NPA (%)	OA (%)
		Placa n.º 1	Placa n.º 2	Placa n.º 3	Placa n.º 1	Placa n.º 2	Placa n.º 3					
1	F508del/+	4	4	4	196	196	196	0	0	100	100	100
2	G542X/+	4	4	4	196	196	196	0	0	100	100	100
3**	R347P/G551D	8	8	8	196	196	196	0	0	100	100	100
4	N1303K/+	4	4	4	196	196	196	0	0	100	100	100
5	1717/+	4	4	4	196	196	196	0	0	100	100	100
6	R553X/+	4	4	4	196	196	196	0	0	100	100	100
7**	A455E/F508del	8	8	8	196	196	196	0	0	100	100	100
8	W1282X/+	4	4	4	196	196	196	0	0	100	100	100
9	I507/+	4	4	4	196	196	196	0	0	100	100	100
10	R1162X/+	4	4	4	196	196	196	0	0	100	100	100
11	WT	0	0	0	196	196	196	0	0	100	100	100
TOTAL		48	48	48	2156	2156	2156	0	0	100	100	100

\*El valor 196 se calcula a partir del número total de picos naturales del resultado de un único ensayo multiplicado por el número de repeticiones de la muestra, es decir,  $49 \times 4$

\*\*Con muestras que tienen dos mutaciones de CF el número de picos de mutaciones se dobla para cada repetición, es decir,  $4 \times 2$

## Precisión: reproducibilidad

### Introducción y protocolo

El objetivo de este estudio era demostrar que el ensayo CF-EU2v1 produce resultados reproducibles de cada analito a partir de un panel de muestras de ADN, en un rango de concentraciones de ADN introducido. La variabilidad se valoró de forma apropiada entre los lotes manufacturados del producto, y entre los días, operadores e instrumentos usados. Para el producto CF-EU2v1 se preparó una configuración experimental en la que se analizó un panel de 48 muestras (formadas por analitos y un control negativo) por triplicado con 3 operadores que usaron 3 lotes manufacturados de material CF-EU2v1. Cada operador siguió de modo independiente el protocolo y según se indica en el documento de las Instrucciones de uso, es decir, en días separados y con equipos diferentes (analizadores genéticos y termocicladores).

### Resultados de las pruebas y conclusiones

El análisis posterior se realizó con el software GeneMapper 5. La reproducibilidad se notifica como concordancia de porcentaje positivo (PPA), concordancia de porcentaje negativo (NPA) y concordancia general (OA). Los resultados del estudio de reproducibilidad, visualizados por muestras, se incluyen en la Tabla 8 siguiente. Estos datos proporcionan pruebas de que el ensayo CF-EU2v1 produce resultados altamente reproducibles.

**Tabla 8: Reproducibilidad del ensayo CF-EU2v1 (por muestra)**

N.º de muestra	Mutaciones presentes	Lecturas concordantes (positivas mutación)			Lecturas concordantes (negativas)			N.º de lecturas erróneas	N.º de lecturas	PPA (%)	NPA (%)	OA (%)
		Lote n.º 1	Lote n.º 2	Lote n.º 3	Lote n.º 1	Lote n.º 2	Lote n.º 3					
1	F508del/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
2	G542X/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
3	R347P/G551D	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
4	N1303K/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
5	1717-1G>A/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
6	R553X/ F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
7	A455E/ F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
8	W1282X/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
9	I507del/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
10	R1162X/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
11	E60X/ F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
12	2184delA/ F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
13**	2789+5G>A/2789+5G>A	9	9	9	432	432	432	0	0	100	100	100
14	3849+10kbC>T/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
15	R334W/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
16	1078delT/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
17	3659delC/ F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
18	G86E/D1152H	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
19	CFdel2,3/ F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
20	3905insT/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
21**	M1101K/M1101K	9	9	9	432	432	432	0	0	100	100	100
22	Y1092X(C>A)/ F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
23	3272-26A>G/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
24	R347H/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
25	3120+1G>A/621+1G>T	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
26	711+1G>T/621+1G>T	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
27	2143delT/ F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
28	V620F/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
29	S1251N gBlock/WT gDNA	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
30	R560T/ F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
31	S549R(T>G)/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100

Dr. HECTOR M. QUIROZ  
BIOQUÍMICO - Mat. 7.385  
DIRECTOR TÉCNICO

N.º de muestra	Mutaciones presentes	Lecturas concordantes gBlock de			Lecturas discordantes gBlock de			N.º de lecturas erróneas	N.º sin lectura	PPA (%)	NPA (%)	QA (%)
		Lote n.º 1	Lote n.º 2	Lote n.º 3	Lote n.º 1	Lote n.º 2	Lote n.º 3					
32	S549N/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
33	444delA/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
34	1811+1.6kbA>G/F508del gBlock	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
35	R117H/F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
36	Y122X/R1158X	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
37	394delTT/+	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
38	1898+1G>A/F508del	18	18	18	441	441	441	0	0	100	100	100
39	P67L gBlock/WT gDNA	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
40	1677delTA gBlock/WT gDNA	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
41	L206W gBlock/WT gDNA	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
42	R117C gBlock/WT gDNA	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
43	2347delG gBlock/WT gDNA	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
44	Q890X gBlock/WT gDNA	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
45	W846X gBlock/WT gDNA	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
46	R1066 gBlock/WT gDNA	9	9	9	441	441	441	0	0	100	100	100
47	WT	0	0	0	441	441	441	0	0	100	100	100
48	-/-	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100
TOTAL		47	47	47	20709	20709	20709	0	0	100	100	100

\*El valor 441 se calcula a partir del número total de picos naturales del resultado de un único ensayo multiplicado por el número de repeticiones de la muestra, es decir,  $49 \times 9$

\*El valor 432 se calcula a partir del número total de picos naturales de un único ensayo con resultado mutante homocigoto multiplicado por el número de repeticiones de la muestra, es decir,  $48 \times 9$

## Sección 7: Limitaciones

### Ámbito del ensayo

1. Los resultados obtenidos con esta o cualquier otra prueba diagnóstica deberían ser utilizados e interpretados únicamente en el contexto del cuadro clínico general. Elucigene Diagnostics no será responsable de ninguna decisión clínica que se tome.
2. La ausencia de las mutaciones detectadas por este kit no es garantía de que otras mutaciones en el gen CFTR no estén presentes. Es posible que haya otras mutaciones y que no sean detectadas por este kit.
3. Las mutaciones varían en cuanto a la frecuencia entre poblaciones diferentes. Pueden obtenerse datos de la frecuencia de mutaciones en distintas poblaciones de: The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (6).

### Sensibilidad analítica: cantidad recomendada de ADN introducido

El ensayo CF-EU2v1 se ha optimizado para el uso de una concentración de ADN introducido de 6ng/μl.

El ensayo produce datos claros interpretables en un rango de concentraciones de ADN introducido. Durante los estudios de validación y verificación los tres lotes arrojaron datos claros y precisos, lo que permitió realizar el diagnóstico clínico correcto con un rango de concentración de 1,5 ng/μl a 18 ng/μl (de 3,75 a un total de 45 ng).

### Especificidad analítica: sustancias con capacidad interferente

El ensayo CF-EU2v1 se ha diseñado para usarse con ADN extraído de muestras de sangre entera (EDTA preservado) y de manchas secas de sangre. No obstante, la calidad de la muestra de ADN puede variar debido a métodos de extracción de ADN deficientes, lo que puede introducir contaminantes que pueden interferir con el rendimiento del ensayo. Estas sustancias con capacidad interferente pueden ser proteínas endógenas (por ejemplo, hemoglobina y triglicéridos) que se arrastran debido a un método de extracción ineficaz o sustancias exógenas (EDTA y heparina) introducidas durante la recogida de la muestra y el proceso de extracción de ADN.

Las posibles sustancias con capacidad interferente (es decir, hemoglobina, triglicéridos y bilirrubina) se agregaron a ADN genómico y se amplificaron con el ensayo CF-EU2v1. Los resultados indicaron que estas cuatro sustancias en las siguientes concentraciones interfieren en la reacción de RCP al usar el ensayo CF-EU2v1:

Sustancia con capacidad interferente	Concentración en la muestra de ADN IC60
Heparina	1,8 U/l
Hemoglobina	14 mg/dl
Bilirrubina	0,39 mg/dl
Triglicéridos	7,55 mg/dl

Se ha informado de que los dispositivos de recogida de muestras en ocasiones han resultado perjudiciales para la integridad de determinados analitos y podrían interferir con algunas tecnologías metodológicas. Se recomienda que cada usuario se asegure de que el dispositivo elegido se utilice de acuerdo con las instrucciones del fabricante y de que los dispositivos de recogida de muestras y los métodos de preparación del ADN sean compatibles con esta prueba.

Los kits Elucigene CF-EU2v1 se han validado con el método de extracción de ADN de los kits Qiagen QIAamp. Con el uso de los métodos de extracción recomendados se reducirá la probabilidad de que falle la prueba como consecuencia del arrastre de sustancias con capacidad interferente.



---

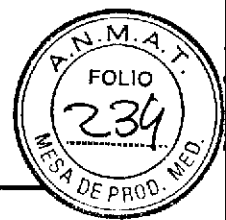
## Especificidad analítica: reactividad cruzada

Se han hecho todo lo humanamente posible durante el desarrollo de la prueba para evitar la interferencia producida en el funcionamiento de la prueba por la presencia de otros polimorfismos y mutaciones notificados en el gen CFTR.

La mutación R1283M, muy poco común, se ha evaluado en cuanto a reactividad cruzada, y no fue detectada por el kit Elucigene CF-EU2v1. Además, los siguientes polimorfismos no fueron detectados por la prueba: 1655T/G (F508C), 1651A/G.

La evaluación de mutaciones y polimorfismos conocidos en el gen CFTR ha puesto de manifiesto los siguientes efectos en los resultados del kit Elucigene CF-EU2v1:

1. El iniciador mutante G551D en la mezcla A detectará también la mutación S549RT>G. El software de análisis etiquetará esto como pico 20. No habrá un pico natural correspondiente en la mezcla B.
2. Se dará una reacción cruzada entre el iniciador mutante 2184delA en la mezcla A y la secuencia de ADN mutante 2183AA>G, que dará lugar a un pico mutante en la posición 2184delA.
3. Se dará una reacción cruzada entre el iniciador mutante 1078delT en la mezcla A y la secuencia de ADN mutante F316L, que dará lugar a un pico mutante en la posición 1078delT.
4. Se dará una reacción cruzada entre el iniciador mutante R347P en la mezcla A y la secuencia de ADN mutante R347H, que dará lugar a un pico mutante en la posición R347P de altura reducida en comparación con un pico R347P verdadero.
5. La presencia del polimorfismo F508C (1655T>G) tendrá como resultado la reducción de la altura del pico I507del en la mezcla B de CF-EU2v1.
6. La presencia de R117H tendrá como resultado la reducción de la altura del pico R117C en la mezcla B de CF-EU2v1. En una muestra homocigota para R117H, faltará el pico R117C.
7. La presencia de G85E tendrá como resultado la reducción de la altura del pico 394delTT en la mezcla B de CF-EU2v1. En una muestra homocigota para G85E, faltará el pico 394delTT.
8. A veces puede observarse un pico de artefacto muy pequeño en la posición I507del en los resultados de una muestra heterocigota para F508del y en particular de una muestra homocigota a F508del.
9. Las siguientes mutaciones, que no se han comprobado en cuanto a posible reactividad cruzada por no disponerse de muestras relevantes, pueden interferir con la función de prueba: R117P, R117L, 1717-2A>G, 621+2T>C, 621+2T>G, R553G, R553Q, R347L, I506T, I506S, I506V y la combinación inusual de I507del con el polimorfismo 1651A/G.



## Sección 8: Bibliografía

### Referencias

1. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998;132:589-95.
2. De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Simard F, Aubin G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet*. 1997;101:208-11
3. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353:1443-53
4. Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:816-21
5. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, y Tsui LC. "Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis." *Science* 1989; **245** (4922): 1073-8
6. Base de datos de mutaciones de fibrosis quística, [www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app)
7. Joshua D. Groman et al. Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Is Pathogenic or Benign. *Am J Hum Genet*. 2004; 74(1): 176-179.
8. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).
10. PCR Primer: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition. ColdSpring Harbour Laboratory Press: Section 1

Dr. HECTOR M. QUIROZ  
BIOQUÍMICO - Mat. 7.335  
DIRECTOR TÉCNICO

## Descargo de responsabilidad

Los resultados de este y de otros ensayos de diagnóstico deberán interpretarse junto con otros datos de laboratorio y clínicos disponibles para el médico.

Estos reactivos de Elucigene se suministran para pruebas de diagnóstico *in vitro*.

ELUCIGENE es una marca comercial de Delta Diagnostics (UK) Ltd.

ARMS es una marca comercial de AstraZeneca UK Ltd. QIAAMP es una marca comercial de Qiagen GmbH. PICOGREEN es una marca comercial de Molecular Probes Inc. GENEMARKER es una marca comercial de Softgenetics Corporation. GENEMAPPER, NED, VIC, PET, POP-7, LIZ y HI-DI son marcas comerciales de Life Technologies Corporation

## AVISO AL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Los polinucleótidos marcados con colorantes VIC, NED y PET y/o su uso pueden estar protegidos por una o más patentes propiedad de Life Technologies Corp. El precio de compra de este producto incluye derechos intransferibles limitados en virtud de ciertas reivindicaciones de ciertas patentes propiedad de Technologies Corp. para utilizar sólo esta cantidad del producto exclusivamente para las actividades del comprador en la detección de objetivo(s) en el campo del diagnóstico humano. No se transfieren otros derechos. Si desea información adicional sobre la compra de licencias en referencia a los colorantes anteriormente mencionados, póngase en contacto con el director de licencias en: [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com).

Copyright © 2017 Delta Diagnostics (UK) Ltd.

## Anexo A: Detalles de marcadores

### Marcadores detectados

Marcador (pico n.º)	Marcador	Rango de tamaño de pico del producto (datos 2-3130/POP7)
01	R347H	110.5-116.5
02	R347P	117-123
03	2789+5G>A	124-130
04	3120+1G>A	132.5-138.5
05	711+1G>T	141.5-147.5
06	R334W	147.5-154
07	I507del	156-162.5
08	F508del	163-169
09	3849+10KbC>T	172-178
10	1677delTA	180-188.5
11	1078delT	193-199
12	V520F	206-211.5
13	L206W	215-220
14	W1282X	224.5-230.5
15	R560T	234.5-240.5
16	2347delG	242-246
17	Q890X	250-252
18	R553X	255.5-261.5
19	G551D	265-267
20	S549R(T>G)*	267.5-269.5
21	S549N	275-280
22	M1101K	282-288
23	G542X	289-295.5
24	3905insT	297-303.5
25	Y1092X(C>A)	308-314
26	S1251N	315-321
27	444delA	323-326
28	1811+1.6kbA>G	332-338
29	1717-1G>A	341.5-347.5
30	R117H	349-355
31	R117C	357-360
32	N1303K	360-366.5
33	Y122X	367-373
34	394delTT	377-383
35	G85E	384-390
36	R1066C	391-397
37	1898+1G>A	398.5-404.5
38	W846X	406-411
39	2184delA	413-418
40	D1152H	423-429
41	CFTRdel2,3	433-439
42	P67L	439.5-445.5
43	2143delT	446-450.5
44	E60X	453.5-460.5
45	3659delC	461-465.5
46	3272-26A>G	470-476
47	621+1G>T	485.5-491.5
48	A455E	496-503
49	R1162X	506-512
50	R1158X	516.5-524.5
5T**	IVS8-5T	110-130

Dr. Hector W. Quiroz  
BIOQUÍMICO - Mat. 7.335  
DIRECTOR TÉCNICO

Marcador (pico n.º)	Marcador	Rango de tamaño de pb del producto (datos 3130/POP7)
7T	IVS8-7T	140-160
9T	IVS8-9T	175-195

\*S549R(T>G)

***El pico 20 solamente está presente en la mezcla A.***

\*\* Tamaños del alelo 5T

Marcador	Rango de tamaño pb del producto (datos 3130/POP7)
5T (9)	117.25 – 118.75
5T (10)	119.25 – 120.75
5T (11)	121.25 – 122.75
5T (12)	123.25 – 124.75
5T (13)	125.25 – 126.75

**NOTA:** Los tamaños de los marcadores pueden variar debido al instrumento y polímero utilizados.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
2019 - Año de la Exportación

**Hoja Adicional de Firmas**  
**Anexo**

**Número:**

**Referencia:** 3110-4050-17-2

---

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 66 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE  
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, c=AR, o=SECRETARIA DE GOBIERNO DE MODERNIZACION,  
ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA, serialNumber=CUIT 30715117564  
Date: 2019.05.21 12:49:46 -03'00'

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE  
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, c=AR, o=SECRETARIA DE GOBIERNO DE MODERNIZACION,  
ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA, serialNumber=CUIT 30715117564  
Date: 2019.05.21 12:49:48 -03'00'

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN  
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-3110-4050-17-2

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por la firma BIOCIENTÍFICA S.A, se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto para diagnóstico de uso in vitro con los siguientes datos característicos:

Nombre comercial: **ELUCIGENE CF-EU2v1.**

Indicación de uso: ENSAYO DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA Y SIMULTANEA DE DIFERENTES MUTACIONES DEL GEN HUMANO REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANOSA DE LA FIBRÓISIS QUÍSTICA EN ADN EXTRAÍDO DE MUESTRAS DE SANGRE ENTERA (EDTA) Y DE MANCHAS DE SANGRE SECA.

Forma de presentación: envases por 10 o [50] determinaciones, conteniendo: CF-EU2v1 primer mix A (1 x 50 µl) o [2 x 120 µl], CF-EU2v1 primer mix B (1 x 50 µl) o [2 x 120 µl], PCR master mix (2 x 75 µl) o [2 x 400 µl] y DNA control (1 x 50 µl).

Período de vida útil y condición de conservación: VEINTICUATRO (24) meses desde la fecha de elaboración, conservado a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .

Nombre y dirección del fabricante: ELUCIGENE DIAGNOSTICS. Citylabs, Nelson Street, M13 9NQ, Manchester. (REINO UNIDO).



Sedes y Delegaciones

Tel. (+54-11) 4340-0800 - <http://www.argentina.gob.ar/anmat> - República Argentina

**Sede Central**  
Av. de Mayo 869, CABA

**Sede Alsina**  
Alsina 665/671, CABA

**Sede INAME**  
Av. Caseros 2161, CABA

**Sede INAL**  
Estados Unidos 25, CABA

**Sede Prod. Médicos**  
Av. Belgrano 1480, CABA

**Deleg. Mendoza**  
Remedios de Escalada de  
San Martín 1909, Mendoza  
Prov. de Mendoza

**Deleg. Córdoba**  
Obispo Trejo 635,  
Córdoba,  
Prov. de Córdoba

**Deleg. Paso de los Libres**  
Ruta Nacional 117, km.10,  
CO.TE.CAR., Paso de los Libres,  
Prov. de Corrientes

**Deleg. Posadas**  
Roque González 1137,  
Posadas, Prov. de  
Misiones

**Deleg. Santa Fé**  
Eva Perón 2456,  
Santa Fé,  
Prov. de Santa Fé

Condición de Venta/Categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO  
PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO  
PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO PM N° 78-191.

Expediente N° 1-47-3110-4050-17-2

Disposición N°

10025

10 DIC 2019

Dr. Waldo Belloso  
Subadministrador Nacional  
ANMAT

**Sedes y Delegaciones**

Tel. (+54-11) 4340-0800 - <http://www.argentina.gob.ar/anmat> - República Argentina

**Sede Central**  
Av. de Mayo 869, CABA

**Sede Alsina**  
Alsina 665/671, CABA

**Sede INAME**  
Av. Caseros 2161, CABA

**Sede INAL**  
Estados Unidos 25, CABA

**Sede Prod. Médicos**  
Av. Belgrano 1480, CABA

**Deleg. Mendoza**  
Remedios de Escalada de  
San Martín 1909, Mendoza  
Prov. de Mendoza

**Deleg. Córdoba**  
Obispo Trejo 635,  
Córdoba,  
Prov. de Córdoba

**Deleg. Paso de los Libres**  
Ruta Nacional 117, km.10,  
CO.TE.CAR., Paso de los Libres,  
Prov. de Corrientes

**Deleg. Posadas**  
Roque González 1137,  
Posadas, Prov. de  
Misiones

**Deleg. Santa Fé**  
Eva Perón 2456,  
Santa Fé,  
Prov. de Santa Fé