



**República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional**  
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

**Disposición**

**Número:**

**Referencia:** 1-0047-3110-001385-23-7

---

VISTO el Expediente N° 1-0047-3110-001385-23-7 del Registro de esta Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), y:

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones Tecnolab S.A. solicita se autorice la inscripción en el Registro Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de esta Administración Nacional, de un nuevo/s Producto/s Médico/s para diagnóstico in vitro, Nombre descriptivo: Uromonitor® es un sistema diseñado para detectar y controlar el carcinoma de vejiga músculo no invasivo mediante la detección de mutaciones de puntos críticos en los genes TERT, FGFR3 y KRAS por PCR en Tiempo Real desde el ADN extraído de células exfoliadas presentes en la orina humana.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro 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 y normas complementarias.

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 modificatorias.

Por ello;

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

DISPONE:

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, Nombre descriptivo: Uromonitor® es un sistema diseñado para detectar y controlar el carcinoma de vejiga músculo no invasivo mediante la detección de mutaciones de puntos críticos en los genes TERT, FGFR3 y KRAS por PCR en Tiempo Real desde el ADN extraído de células exfoliadas presentes en la orina humana, de acuerdo con lo solicitado por Tecnolab S.A. con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2023-147003055-APN-INPM#ANMAT .

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM 1252-221 ", con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

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

ARTÍCULO 5º.- La vigencia del Certificado de Autorización será de cinco (5) años, a partir de la fecha de la presente disposición.

ARTÍCULO 6º.- 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 CARACTERÍSTICOS

Nombre descriptivo: Uromonitor® es un sistema diseñado para detectar y controlar el carcinoma de vejiga músculo no invasivo mediante la detección de mutaciones de puntos críticos en los genes TERT, FGFR3 y KRAS por PCR en Tiempo Real desde el ADN extraído de células exfoliadas presentes en la orina humana.

Marca comercial: Uromonitor®

Modelos:

Uromonitor® integra un flujo de trabajo conformado por los siguientes kits que deben ser utilizados en su conjunto como un sistema:

1) UroKit 1 - Urine filtering kit (Referencia: PUF50).

2) UroKit 2 - DNA extraction and preparation kit (Referencia: PADNP50).

3) Urokit 3 - Real-Time PCR kit for the amplification and detection of TERT, FGFR3 and KRAS hotspot mutations (Referencia: PRTPCR50). A su vez este kit está compuesto por 4 kits: 3a) PRTPCR50-T (para mutaciones TERT), 3b) PRTPCR50-F (para mutaciones FGFR3), 3c) PRTPCR50-K (para mutaciones KRAS) y 3d) PRTPCR50-C (controles).

Indicación/es de uso:

1) kit de filtrado de orina para concentrar las células exfoliadas que se encuentran en dicha muestra. El Urokit 1 se presenta como parte del flujo de trabajo de la prueba Uromonitor® y debe ser usado como un sistema junto al Urokit 2 y 3.

2) Kit para la preparación y extracción de ADN desde las células filtradas con el Urokit 1. Este kit provee un método rápido y eficiente para la purificación de ADN celular de alta calidad desde las células exfoliadas presentes en la orina. El eluido de ADN purificado es adecuado para usarse con el procedimiento de PCR en tiempo real de la prueba Uromonitor (Urokit 3). El Urokit 2 se presenta como parte del flujo de trabajo de la prueba Uromonitor® y debe ser usado como un sistema junto al Urokit 1 y 3.

3) kit de PCR en Tiempo Real para amplificación y la detección de mutaciones en el promotor del gen TERT, en los codones 248 y 249 del gen FGFR3, y en los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS. El Urokit 3 se presenta como una parte del flujo de trabajo de la prueba Uromonitor® y debe ser usado como un sistema junto al Urokit 2 y 3.

Forma de presentación: 1) Kit para 50 muestras. Compuesto por: 50 x bolsas de plástico con cierre hermético con etiqueta para identificación de muestra, 50 x Jeringas de 10 mL, 50 x filtros redondos y 100 x tapas de filtro.

2) Kit para 50 muestras. Compuesto por: 50 x jeringas de 5 mL, 50 x tubos de 2 mL para la lisis celular, 50 x adaptadores del filtro de jeringa, 1 x Buffer de Lisis Celular por 30 ml, 1 x Proteinasa K (provisto en el urokit 3) de 1100 µL, 1 x Solución Normalizadora de 4 ml, 1 x Solución de Lavado de 30 mL, 1 x Solución de Lavado 2 de 12.5 mL, 50 x columnas de centrifugación, 100 x tubos de recolección de 2 mL, 50 x tubos de elución 1.5 mL y 1 x Buffer de Elución de 3 mL.

3) El Urokit 3 se compone por las siguientes 4 cajas:

3a) kit para 50 muestras. Referencia: PRTPCR50-T. Kit de PCR a Tiempo Real para el screening de mutaciones de punto caliente del gen TERT. Compuesto por los siguientes viales: 1 x TERT\_RMT por 1300 µL, 1 x TERT\_RTA por 116 µL, 1 x TERT\_RTb por 116 µL, 1 x TERT\_R1-124 por 26 µL, 1 x TERT\_R2-124 por 26 µL, 1 x TERT\_R1-146 por 26 µL, 1 x TERT\_R2-146 por 26 µL y 1 x H2O por 1000 µL.

3b) kit para 50 muestras. Referencia: PRTPCR50-F. Kit de PCR a Tiempo Real para el screening de mutaciones de punto caliente del gen FGFR3. Compuesto por los siguientes viales: 1 x FGFR3\_RMF de 1960 µL, 1 x FGFR3\_RFA de 260 µL, 1 x FGFR3\_RFB de 78 µL, 1 x FGFR3\_R1-248 de 34 µL, 1 x FGFR3\_R2-248 de 34 µL, 1 x FGFR3\_R1-249 de 34 µL, 1 x FGFR3\_R2-249 de 34 µL, 1 x FGFR3\_R1-CTRL de 34 µL, 1 x FGFR3\_R2-CTRL de 34 µL y 1 x H2O por 1000 µL.

3c) kit para 50 muestras. Referencia: PRTPCR50-K. Kit de PCR a Tiempo Real para el screening de mutaciones de punto caliente del gen KRAS). Compuesto por los siguientes viales: 1 x KRAS\_RMK por 1300 µL, 1 x KRAS\_RKA-12/13 por 58 µL, 1 x KRAS\_RKB-12/13 por 58 µL, 1 x KRAS\_R1-12/13 por 34 µL, 1 x KRAS\_R2-

12/13 por 26 µL, 1 x KRAS\_RKA-61 por 58 µL, 1 x KRAS\_RKB-61 por 58 µL, 1 x KRAS\_R1-61 por 34 µL, 1 x KRAS\_R2-61 x 26 µL y 1 x H2O por 1000 µL

3d) Kit para 50 muestras. Referencia: PRTPCR50-C. Kit con controles positivos y negativos de ADN para usar con la amplificación de los ensayos TERT, FGFR3 y KRAS, y Proteinasa K para la extracción de DNA. Compuesto por los siguientes viales: 1 x TERT/FGFR3/KRAS-NC por 20 µL, 1 x TERT\_124+ por 20 µL, 1 x TERT\_146+ por 20 µL, 1 x FGFR3\_248+ por 20 µL, 1 x FGFR3\_249+ por 20 µL, 1 x KRAS\_All+ por 20 µL y 1 x Proteinasa K (componente del UROKIT2) por 1100 µL.

Período de vida útil y condición de conservación: 1) 24 meses desde la fecha de elaboración cuando es conservado a temperatura ambiente (15°C a 30 °C).

2) 12 meses desde la fecha de elaboración cuando es conservado a temperatura ambiente (15°C a 30 °C).

3a) 3b) 3c) y 3d) 12 meses desde la fecha de elaboración cuando es conservado de 2°C a 8 °C

Nombre del fabricante:  
Infogene LDA

Lugar de elaboración:  
IPN Edificio D,  
Rua Pedro Nunes,  
3030-199,  
Coimbra,  
Portugal

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Expediente N° 1-0047-3110-001385-23-7

N° Identificadorio Trámite: 46540

am



## Uromonitor® - Urine filtering kit

### Producto #UROKIT1 (PUF50)

#### **Uso previsto**

El kit de filtrado de orina (UROKIT1) se presenta como parte del flujo de trabajo de la prueba Uromonitor®. La prueba Uromonitor® está diseñada para detectar y controlar el carcinoma de vejiga músculo no invasivo mediante la detección de mutaciones de puntos críticos en los genes TERT, FGFR3 y KRAS en el ADN derivado de células exfoliadas presentes en la orina. Las muestras se procesan utilizando el kit de filtrado de orina (Urokit1), el kit de extracción y preparación de ADN (Urokit2) y el kit de PCR en tiempo real para la amplificación y detección de mutaciones de puntos críticos de TERT, FGFR3 y KRAS (Urokit3).

#### **Descripción del Producto**

El “Uromonitor® – Urine filtering kit” proporciona los componentes necesarios para la toma de muestras. El principio del procedimiento se basa en la filtración de muestras de orina. Usando una jeringa, las muestras de orina pasarán a través de un filtro donde las células quedan atrapadas para los procedimientos posteriores.

#### **Componentes del kit**

El kit es provisto con materiales suficientes para 50 muestras. Para cada muestra se suministran los siguientes componentes:

Componente	Contenido
Bolsa con cierre hermético con etiqueta para identificación de muestra	1 unidad
Jeringa de 10 mL	1 unidad
Filtro Redondo	1 unidad
Tapas de filtro	2 unida

#### **Criterios de exclusión**

Se deben cumplir los siguientes criterios para que las muestras de orina sean adecuadas para la prueba Uromonitor®:

- El paciente debe poder proporcionar una cantidad mínima de 10 ml de orina. Este es el volumen más pequeño que consistentemente proporciona suficiente material para la prueba.
- La recolección de orina no tiene restricciones. No es necesario que se realice con el estómago vacío ni que sea la primera orina de la mañana.
- Las instilaciones intravesicales pueden interferir con la capacidad de recolectar células de la orina. Como tal, los pacientes que se someten a tratamientos intravesicales no deben realizar la prueba el mismo día de un tratamiento intravesical.
- Después de la recolección, la orina se puede mantener a temperatura ambiente y se debe filtrar dentro de 4 a 6 horas. Las muestras de orina mantenidas durante más de 6 horas a temperatura ambiente no son adecuadas para la prueba.
- Después de la filtración, los filtros de orina se pueden almacenar hasta 14 días a 4-8 °C, antes de la extracción de ADN. Es posible que los filtros almacenados durante períodos más prolongados o a temperaturas más altas no proporcionen el material adecuado para las pruebas.

## Protocolo para la recolección y la filtración de orina

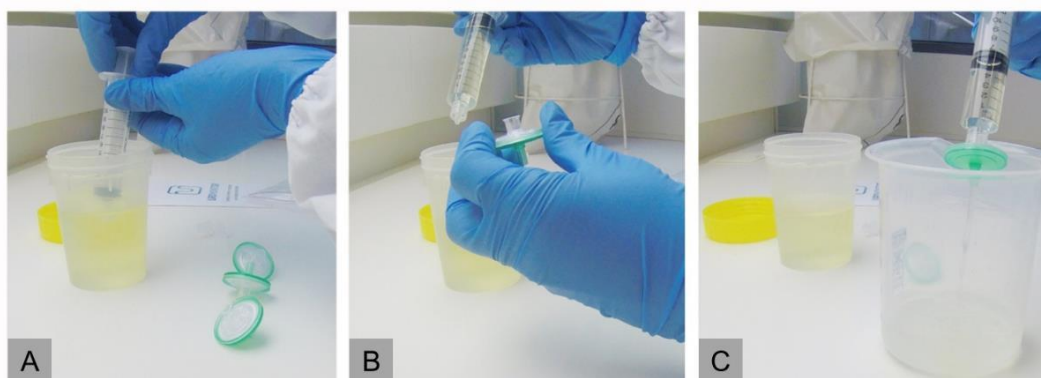
### 1. Recolección de orina

- 1.1. **Recoja la orina** en un recipiente de recolección (no suministrado con el kit) – volumen mínimo de 10 mL.
- 1.2. Proceda con la filtración de la muestra o almacene el recipiente hasta la filtración. **Las muestras de orina se pueden almacenar a temperatura ambiente hasta 6 horas después de la recolección.**

### 2. Filtración de orina

- 2.1. **Identificar la muestra** anotando en la bolsa hermética provista por el kit, la referencia del paciente, **fecha y tiempo de recolección y fecha y tiempo de la filtración de la orina.**
- 2.2. Recolecte **10 ml de muestra de orina** desde el recipiente de recolección **usando la jeringa** provista en el kit (Figura A).
- 2.3. **Enrosque el filtro** en el extremo de la jeringa (Figura B).
- 2.4. **Empuje el émbolo de la jeringa** para extraer todo el volumen de orina a través del filtro hacia un contenedor de desechos (Figura C).
- 2.5. Desenrosque el filtro y **cubra los extremos con las tapas** provistas
- 2.6. **Proceda con el protocolo de extracción de ADN** (#Urokit2) o almacene los filtros dentro de la bolsa etiquetada provista hasta **14 días a 4-8°C.**

Mire el procedimiento completo de filtración de orina aquí: <https://www.youtube.com/watch?v=UgnfL3-hH6Y>



## Uromonitor® - DNA extraction and preparation kit

### Producto #UROKIT2 (PADNP50)

#### **Descripción del producto**

El “Uromonitor® - DNA Extraction and preparation kit” es presentado como parte del flujo de trabajo de la prueba Uromonitor® y no puede ser vendido en forma separada. Este kit de preparación y extracción de ADN provee un método rápido y eficiente para la purificación de ADN celular de alta calidad desde las células exfoliadas presentes en la orina. El eluido de ADN purificado es adecuado para usarse con el procedimiento de PCR en tiempo real de la prueba Uromonitor (Urokit3).

#### **Control de Calidad**

La Calidad del “Uromonitor® - DNA Extraction and preparation kit” es evaluada en cada lote aislando el ADN celular de 10 ml de orina recolectada.

#### **Precaución**

El tampón de lisis celular (Lysbuffer) contiene sal caotrópica que es un irritante dañino. Durante la operación, siempre use guapoldo de laboratorio, guantes desechables y gafas protectoras.

Para evitar la contaminación por DNasa, debería usar plásticos desechables. Las pipetas automáticas o los auxiliares de laboratorio no desechables deben ser estériles/sin DNasa y ser usados solo para procedimientos de extracción de ADN. Durante su manipulación, siempre deben usarse guantes.

#### **Reactivos y equipamiento suministrados por el usuario**

- Microcentrifuga
- Micropipetas
- Etanol al 96 – 100% de grado molecular.
- Termomezclador (hasta 60°C y 600 rpm)



MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA M.N. 9483  
DT. TECNOLAB S.A.

#### **Condiciones de almacenamiento y estabilidad del producto**

Todos los tampones (buffers) deben mantenerse herméticamente sellados y almacenados a temperatura ambiente (15-30 °C) durante un máximo de 12 meses sin mostrar ninguna reducción en el rendimiento.

“Uromonitor® - Kit de preparación y extracción de ADN” contiene una solución de proteinasa K lista para usar, que se disuelve en un tampón de almacenamiento especialmente preparado. La proteinasa K se envía junto con los reactivos de PCR en tiempo real #Urokit3 (caja PRTPCR50-C). A su llegada debe almacenarse a -20°C donde es estable hasta por 12 meses.

#### **Notas**

Agregar 15 mL de etanol grado biología molecular (96%-100%) [no provisto] a la Solución Normalizadora o Normalizing Solution (Norm Sol) antes de su uso inicial. Después de agregar el etanol, marque la botella para indicar que este paso se ha completado.

Agregar 25 mL de etanol grado biología molecular (96%-100%) [no provisto] a la Solución de Lavado 2 o Washing Solution 2 (WashSol-2) antes de su uso inicial. Después de agregar el etanol, marque la botella para indicar que este paso se ha completado.

## Protocolo para la extracción de ADN de células exfoliadas de la orina

### 1. Componentes del kit

Componente	Referencia - Nombre	Contenido
Jeringa de 5 mL	<b>Syringe5ml</b>	50 unidades
Tubo de 2 mL para la lisis celular	<b>LysTube</b>	50 unidades
Adaptador del filtro de jeringa	<b>Adaptor</b>	50 unidades
Buffer de Lisis Celular	<b>LysBuffer</b>	30 mL
Proteinasa K*	<b>ProtK*</b>	1100 µL
Solución Normalizadora	<b>NormSol</b>	4 mL
Solución de Lavado 1	<b>WashSol-1</b>	30 mL
Solución de Lavado 2	<b>WashSol-2</b>	12.5 mL
Columna de centrifugación	<b>SpinCol</b>	50 unidades
Tubos de recolección de 2 mL	<b>ColTube</b>	100 unidades
Tubo de elución 1.5 mL	<b>EluTube</b>	50 unidades
Buffer de Elución	<b>EluBuffer</b>	3 mL

\* La Proteinasa K es enviada en el Urokit3, reactivos de PCR en tiempo real (caja PRTPCR50-C).

### 2. Procedimiento

**Nota:** antes de la extracción, precalentar el volumen necesario de buffer de elución [50 µL x (número de muestras + 2)] a 60 °C en un termomezclador.

1. Invierta la posición del filtro y colóquelo encima del tubo de lisis celular de 2 ml (**LysTube**).
2. Retire el émbolo de una jeringa de 5 ml (**Syringe5ml**); Conecte el cilindro de la jeringa de 5 ml al filtro, utilizando el adaptador del filtro de jeringa provisto (**Adaptor**).
3. Agregue 400 µL de Buffer de Lisis Celular (**LysBuffer**) al cilindro de la jeringa y filtre la solución a través del filtro en el **LysTube**.
4. Agite enérgicamente (vortex durante 5 segundos) el **LysTube** que contiene la solución filtrada.
5. Incubar el **LysTube** 30 min en un termomezclador a 60°C bajo agitación (600 rpm).
6. Luego de la incubación, agregar 20 µL de Proteinasa K (**ProtK**) al tubo e incubar otros 10 minutos a 60°C.
7. Luego de la incubación, agregar 450 µL de Solución Normalizadora (**NormSol**)<sup>1</sup> al lisado de muestra y mezcle bien agitando en vórtex durante 5 segundos.
8. Transferir 600 µL de la mezcla del lisado a la columna provista (**SpinCol**).
9. Centrifugue a 3,300g por 1 min. Deseche el líquido y vuelva a colocar la columna en el tubo de recolección. Transfiera la mezcla de lisado restante a la columna y centrifugue nuevamente a 3.300 g durante 1 min.



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA S.A. M.N. 9483  
DT. TECNO LAB S.A.



10. Deseche el líquido y vuelva a colocar la columna en el tubo de recolección. Centrifugar a 16.000g durante 1 min para secar la matriz de la columna.
11. Deseche el tubo de recolección que contiene el líquido y coloque el **SpinCol** en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (**CoITube**).
12. Agregar 400 µL de Solución de Lavado 1 (**WashSol-1**) y centrifugar a 15.000g por 1 min. Deseche el líquido y vuelva a colocar la columna en el tubo de recolección. Añadir 600 µL de Solución de lavado 2 (**WashSol- 2**)<sup>1</sup> y centrifugar a 15.000g durante 1 min.
13. Deseche el líquido y vuelva a colocar la columna de centrifugación en el tubo de recolección y centrifugue durante otros 4 minutos a 16.000 g para secar la matriz de la columna.
14. Transfiera la columna de centrifugación a un tubo de elución de 1,5 ml proporcionado (**EluTube**) y pipetee 25 µl de tampón de elución precalentado (**EluBuffer**) directamente en el centro de la columna de centrifugación sin tocar la membrana. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
15. Centrifugar durante 1 minuto a 400 g, seguido de 2 minutos a 5800 g.
16. Agregue otros 25 µL de **EluBuffer** precalentado al centro de la columna de centrifugación sin tocar la membrana. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos (no cambie a un tubo de elución nuevo).
17. Centrifugar durante 1 minuto a 400 g, seguido de 2 minutos a 5800 g.
18. Conservar el ADN a 4 °C hasta 48 h. Para uso a largo plazo, almacenar a -20°C.

<sup>1</sup> corroborar si el etanol ha sido agregado

Luego de este procedimiento, el ADN está listo para la aplicación posterior del procedimiento de la prueba Uromonitor®. Siguiendo este protocolo, proceda al protocolo Urokit3.



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

# Uromonitor® - Real-Time PCR kit for the amplification and detection of TERT, FGFR3 and KRAS hotspot mutations

Producto #UROKIT3 (PRTPCR50)



## **Descripción del producto**

El kit de PCR en Tiempo Real para la amplificación y detección de mutaciones de puntos calientes en los genes TERT, FGFR3 y KRAS, “Uromonitor® - Real-Time PCR kit for the amplification and detection of TERT, FGFR3 and KRAS hotspot mutations”, es presentado como una parte del flujo de trabajo de la prueba Uromonitor®. Este kit provee un método rápido y eficiente para la amplificación y la detección de mutaciones en el promotor del gen TERT, en los codones 248 y 249 del gen FGFR3, y en los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS, a través de un método de PCR a tiempo Real específico y altamente sensible.

## **Control de Calidad**

La calidad del “Uromonitor® - Real-Time PCR kit for the amplification and detection of TERT, FGFR3 and KRAS hotspot mutations” es evaluada lote a lote. La precisión y la especificidad de cada lote se asegura evaluando por triplicado la amplificación de 5 muestras independientes de ADN para cada alteración detectada (TERT\_124+, TERT\_124\_WT, TERT\_146+, TERT\_146\_WT, FGFR3\_248+, FGFR3\_249+, FGFR3\_CTRL, KRAS\_G12X/13X+, KRAS\_G12X/13X\_IC, KRAS\_Q61X+ and KRAS\_Q61X\_IC).

## **Precaución**

Para evitar la contaminación por ADN/ARN, se debe utilizar material de plástico desechable. Las pipetas automáticas y el material de vidrio o plástico no desechable deben ser estériles/sin ADN/ARN y deben usarse solo para procedimientos de preamplificación. Al manipular/realizar el protocolo completo, siempre se deben usar guantes.

## **Reactivos y equipamiento suministrados por el usuario**

- Micropipetas y tips con filtro compatibles.
- Espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Nanodrop ND-1000/ND-2000) o equivalente.
- Tubos 1,5 mL RNasa/DNasa “PCR ready” con cierre seguro para microcentrifuga.
- Microplacas ópticas y películas de sellado óptico o equivalentes.
- Instrumento de PCR a Tiempo Real equivalente con tecnología VeriFlex™ Block<sup>1</sup> capaz de detectar fluoróforos FAM y HEX/VIC, incluyendo el software de análisis correspondiente para detección de mutaciones de punto caliente TERT/FGFR3/KRAS.

<sup>1</sup> Permite el análisis todo en uno de las mutaciones TERT-124/-146, FGFR3 248/249 y KRAS G12/13 y Q61 (detalladas abajo). En caso de que esta tecnología no esté disponible, la detección de mutaciones de TERT-124/-146 y FGFR3 248/249 deben realizarse en corridas separadas.

## **Condiciones de almacenamiento, estabilidad del producto y recomendaciones del procedimiento**

- Una vez recibido el kit, los reactivos de Urokit3 deben almacenarse a -20°C y son estables hasta 12 meses. Una vez abierto, cada reactivo es estable a 4 ciclos de congelaciones y descongelaciones. Por lo tanto, se recomienda dividir los reactivos en alícuotas de trabajo que permitan, de cada reactivo, un solo uso.

- Inmediatamente antes de cada uso, deje que cada reactivo se descongele en hielo durante al menos 15 minutos y protegido de la luz. Una vez descongelados por completo, mantenga los reactivos en hielo y utilícelos inmediatamente. En caso de que los reactivos no se hayan alícuotado previamente para un solo uso, almacene el resto inmediatamente a -20 °C hasta el próximo uso.
- Todos los reactivos y mezclas (preparados en el siguiente procedimiento) deben prepararse y almacenarse protegidos de la luz.
- Los controles de ADN deben descongelarse inmediatamente antes de su uso y agregarse a la reacción en el mismo intervalo de tiempo que las muestras de ADN.
- La amplificación por PCR en tiempo real debe iniciarse inmediatamente después de agregar las muestras y los controles de ADN a la mezcla preparada.



## Protocolo para la amplificación y detección de mutaciones de punto caliente TERT, FGFR3 y KRAS.

### 1. Componentes del kit

Referencia del Kit	Componente/N° de Ref	Contenido
<b>PRTPCR50-T</b> (Kit de PCR a Tiempo Real para el screening de mutaciones de punto caliente del gen TERT)	TERT_RMT	1300 µL
	TERT_RTA	116 µL
	TERT_RT B	116 µL
	TERT_R1-124	26 µL
	TERT_R2-124	26 µL
	TERT_R1-146	26 µL
	TERT_R2-146	26 µL
	H2O	1000 µL
<b>PRTPCR50-F</b> (Kit de PCR a Tiempo Real para el screening de mutaciones de punto caliente del gen FGFR3)	FGFR3_RMF	1960 µL
	FGFR3_RFA	260 µL
	FGFR3_RFB	78 µL
	FGFR3_R1-248	34 µL
	FGFR3_R2-248	34 µL
	FGFR3_R1-249	34 µL
	FGFR3_R2-249	34 µL
	FGFR3_R1-CTRL	34 µL
	FGFR3_R2-CTRL	34 µL
	H2O	1000 µL
<b>PRTPCR50-K</b> (Kit de PCR a Tiempo Real para el screening de mutaciones de punto caliente del gen KRAS)	KRAS_RMK	1300 µL
	KRAS_RKA-12/13	58 µL
	KRAS_RKB-12/13	58 µL
	KRAS_R1-12/13	34 µL
	KRAS_R2-12/13	26 µL
	KRAS_RKA-61	58 µL
	KRAS_RKB-61	58 µL
	KRAS_R1-61	34 µL
	KRAS_R2-61	26 µL
	H2O	1000 µL

<b>PRTPCR50-C</b> (Controles de ADN positivos y negativos para usar con la amplificación de los ensayos TERT, FGFR3 y KRAS, y Proteínasa K para la extracción de DNA)	<b>TERT/FGFR3/KRAS-NC</b>	20 µL
	<b>TERT_124+</b>	20 µL
	<b>TERT_146+</b>	20 µL
	<b>FGFR3_248+</b>	20 µL
	<b>FGFR3_249+</b>	20 µL
	<b>KRAS_All+</b>	20 µL
	<b>Proteínasa K (#UROKIT2)</b>	1100 µL

### Notas

- Se necesitan al menos 25 ng de ADN por pocillo para usar en la prueba Uromonitor® de mutación TERT/FGFR3/KRAS. Es posible que cualquier muestra que contenga menos de 25 ng de ADN por pocillo no proporcione los resultados deseados
- La prueba Uromonitor® de mutación TERT/FGFR3/KRAS contiene suficientes reactivos (más los controles) para probar un máximo de 50 muestras por kit.
- Para evitar la contaminación de los y las mezclas de trabajo con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área separada del aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse a fondo antes de preparar las mezclas de trabajo. Para una limpieza adecuada, todas las superficies, incluidas las gradillas y las pipetas, deben limpiarse a fondo con una solución de etanol al 70 %.

## 2. Cuantificación de ADN

1. Mezcle suavemente cada ADN (previamente extraído usando UROKIT2) durante 5 segundos.
2. Cuantifique cada ADN utilizando un espectrofotómetro Nanodrop UV-vis (ND-1000/ND-2000) de acuerdo con el protocolo del fabricante o con un método equivalente. Use **Elubuffer** de Urokit2 como el blanco para el instrumento.

## 3. Cálculo de la dilución de las muestras de ADN

### **Importante:**

- *El ADN de las muestras debe diluirse inmediatamente antes de la amplificación y detección.*
- *Se ejecutan dos (2) réplicas de amplificación/detección para cada mutación que requiere 50 ng de ADN por detección de mutación (25 ng por replicidad) y un total de 325 ng de ADN por muestra para el procedimiento completo.*

### **a) Cálculo para la dilución de ADN con concentraciones $\geq 25$ ng/µL**

A concentraciones de ADN  $\geq 25$  ng/µL, diluya el ADN para usar un máximo de 25 ng en 1 µl de ADN diluido por reacción.



MARISOL MASINO  
 BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.

## b) Cálculo para la dilución de ADN con concentraciones $\leq 25$ ng/ $\mu$ L

Para cada muestra, calcule el volumen ( $\mu$ l) de ADN necesario para obtener 25 ng de ADN y use hasta 2,5  $\mu$ l de ADN por reacción. Si la concentración es demasiado baja ( $\leq 10$  ng/ $\mu$ l), use 2.5  $\mu$ l de ADN por reacción.

La prueba Uromonitor® de mutación TERT/FGFR3/KRAS se verificó para su uso con 25 ng de ADN por reacción/pocillo. No se recomiendan cantidades de entrada de ADN inferiores a 25 ng por reacción/pocillo y por encima de 75 ng por reacción/pocillo.

## 4. Protocolo para la amplificación y la detección de mutaciones de puntos calientes de TERT

Consulte el manual de uso del operador del instrumento de PCR en tiempo real para obtener instrucciones detalladas sobre la programación de los protocolos de amplificación TERT -124 y TERT -146, con los siguientes pasos de flujo de trabajo.

### 4.1. Configuración del instrumento para mutaciones de puntos calientes de TERT -124 y TERT-146 (todo en uno)

#### Instrumento StepOnePlus™

##### **Importante:**

El protocolo detallado a continuación utiliza el software StepOne™. Otros equipos y/o softwares pueden requerir diferentes enfoques de configuración. Póngase en contacto con el soporte técnico de Uromonitor si necesita ayuda. Para garantizar un rendimiento de ensayo óptimo, asegúrese de que su instrumento esté calibrado para FAM y HEX/VIC.

1. Cree un nuevo experimento: File > New Experiment > Advanced Setup.

#### Propiedades del experimento

2. Ingrese el nombre del experimento y seleccione el instrumento StepOnePlus™ (96 pocillos).
3. Seleccione **Quantitation - Comparative C<sub>T</sub> ( $\Delta\Delta C_T$ )** para el tipo de experimento.
4. Seleccione **TaqMan® Reagents** y **FAST** para tipo de reactivos y velocidad de rampa, respectivamente.
5. Haga click en **Plate Setup** en el menú de navegación izquierdo.

#### En la pestaña definir targets y muestras

6. En la sección **Define Targets**, hacer click en **Add New Target** y configurar los targets como se muestra en la tabla de abajo:

Target	Reportero	Quencher
TERT_124 Mut	FAM	ZEN-lowaBlack FQ
TERT_124 WT	HEX/VIC	ZEN-lowaBlack FQ
TERT_146 Mut	FAM	ZEN-lowaBlack FQ
TERT_146 WT	HEX/VIC	ZEN-lowaBlack FQ



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

- En la sección **Define Samples**, hacer click en **Add New Sample** y agregar NTC para control sin molde (agua), NC para control negativo (TERT/FGFR3/KRAS-NC), TERT\_124+ y TERT\_146+ para controles positivos y el número/nombre de las muestras.

#### En la pestaña asignar targets y muestras

- Asignar targets para seleccionar pocillos en la vista del diseño de la placa como se muestra abajo marcando las casillas de objetivos en la sección **Asignar objetivo(s)** a los pocillos seleccionados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	NTC TERT 124 Mix	NC TERT 124 Mix	TERT_124+ TERT 124 Mix		Sample 15 TERT 124 Mix	Sample 15 TERT 124 Mix	NTC TERT 146 Mix	NC TERT 146 Mix	TERT_146+ TERT 146 Mix		Sample 15 TERT 146 Mix	Sample 15 TERT 146 Mix
<b>B</b>	Sample 1 TERT 124 Mix	Sample 1 TERT 124 Mix	Sample 8 TERT 124 Mix	Sample 8 TERT 124 Mix	Sample 16 TERT 124 Mix	Sample 16 TERT 124 Mix	Sample 1 TERT 146 Mix	Sample 1 TERT 146 Mix	Sample 8 TERT 146 Mix	Sample 8 TERT 146 Mix	Sample 16 TERT 146 Mix	Sample 16 TERT 146 Mix
<b>C</b>	Sample 2 TERT 124 Mix	Sample 2 TERT 124 Mix	Sample 9 TERT 124 Mix	Sample 9 TERT 124 Mix	Sample 17 TERT 124 Mix	Sample 17 TERT 124 Mix	Sample 2 TERT 146 Mix	Sample 2 TERT 146 Mix	Sample 9 TERT 146 Mix	Sample 9 TERT 146 Mix	Sample 17 TERT 146 Mix	Sample 17 TERT 146 Mix
<b>D</b>	Sample 3 TERT 124 Mix	Sample 3 TERT 124 Mix	Sample 10 TERT 124 Mix	Sample 10 TERT 124 Mix	Sample 18 TERT 124 Mix	Sample 18 TERT 124 Mix	Sample 3 TERT 146 Mix	Sample 3 TERT 146 Mix	Sample 10 TERT 146 Mix	Sample 10 TERT 146 Mix	Sample 18 TERT 146 Mix	Sample 18 TERT 146 Mix
<b>E</b>	Sample 4 TERT 124 Mix	Sample 4 TERT 124 Mix	Sample 11 TERT 124 Mix	Sample 11 TERT 124 Mix	Sample 19 TERT 124 Mix	Sample 19 TERT 124 Mix	Sample 4 TERT 146 Mix	Sample 4 TERT 146 Mix	Sample 11 TERT 146 Mix	Sample 11 TERT 146 Mix	Sample 19 TERT 146 Mix	Sample 19 TERT 146 Mix
<b>F</b>	Sample 5 TERT 124 Mix	Sample 5 TERT 124 Mix	Sample 12 TERT 124 Mix	Sample 12 TERT 124 Mix	Sample 20 TERT 124 Mix	Sample 20 TERT 124 Mix	Sample 5 TERT 146 Mix	Sample 5 TERT 146 Mix	Sample 12 TERT 146 Mix	Sample 12 TERT 146 Mix	Sample 20 TERT 146 Mix	Sample 20 TERT 146 Mix
<b>G</b>	Sample 6 TERT 124 Mix	Sample 6 TERT 124 Mix	Sample 13 TERT 124 Mix	Sample 13 TERT 124 Mix	Sample 21 TERT 124 Mix	Sample 21 TERT 124 Mix	Sample 6 TERT 146 Mix	Sample 6 TERT 146 Mix	Sample 13 TERT 146 Mix	Sample 13 TERT 146 Mix	Sample 21 TERT 146 Mix	Sample 21 TERT 146 Mix
<b>H</b>	Sample 7 TERT 124 Mix	Sample 7 TERT 124 Mix	Sample 14 TERT 124 Mix	Sample 14 TERT 124 Mix	Sample 22 TERT 124 Mix	Sample 22 TERT 124 Mix	Sample 7 TERT 146 Mix	Sample 7 TERT 146 Mix	Sample 14 TERT 146 Mix	Sample 14 TERT 146 Mix	Sample 22 TERT 146 Mix	Sample 22 TERT 146 Mix

- Seleccione **None** (ninguno) en la sección **Select the dye** para usar como referencia pasiva.
- En **View Plate Layout** (Vista del Diseño de la Placa), chequear la casilla **Enable VeriFlex™ Block**.
- Hacer click en **Run Method** en el menú de navegación izquierdo para configurar los parámetros de ciclado enumerados abajo.

#### Ensayo TERT -124/-146

Programa de termociclado (VeriFlex)



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	20 seg	45
Annealing*	68°C (TERT -124) 64°C (TERT -146)	45 seg	

\* Recolectar datos

12. Asegúrese de que la **Temperatura de Annealing** esté configurada correctamente para el bloque/objetivo correspondiente y que esté seleccionado **Data Collected On** para el paso de Annealing.
13. Ingrese 10 µL en el campo **Reaction Volume Per Well** (volumen de reacción por pocillo).
14. Guarde el experimento y proceda a la preparación de la placa.

#### 4.2. Preparación de la placa TERT-124/-146 todo en uno

1. Calcular el volumen de cada reactivo para preparar Mix TERT -124 y Mix TERT -146, necesarios para las muestras que se están analizando
2. En los cálculos incluya:
  - 2 replicados por muestra por mix.
  - 1 reacción extra para el NTC por cada mix.
  - 2 reacciones extras para los controles negativo y positivo para cada mix.
  - 5% más de volumen por errores de pipeteo.
3. Descongele todos los reactivos necesarios **en hielo** y mézclelos suavemente durante 3 a 5 segundos antes de usarlos.
4. Organice la distribución de la muestra de acuerdo con el diseño del paso "Configuración del instrumento" y prepare **Mix TERT -124** y **Mix TERT -146** respetando las siguientes cantidades:



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

TERT -124 Mix	
Reactivo	Volumen por pocillo
TERT_RMT	5 µL
TERT_RTA	0.45 µL
TERT_RTB	0.45 µL
TERT_R1-124	0.20 µL
TERT_R2-124	0.20 µL
H2O	2.70 µL
<b>Mix</b>	<b>9 µL</b>
<b>DNA (25 ng/µL)</b>	<b>1 µL</b>
<b>Volumen Final</b>	<b>10 µL</b>

TERT -146 Mix	
Reactivo	Volumen por pocillo
TERT_RMT	5 µL
TERT_RTA	0.45 µL
TERT_RTB	0.45 µL
TERT_R1-146	0.20 µL
TERT_R2-146	0.20 µL
H2O	2.70 µL
<b>Mix</b>	<b>9 µL</b>
<b>DNA (25 ng/µL)</b>	<b>1 µL</b>
<b>Volumen Final</b>	<b>10 µL</b>

#### Ejemplo

Preparación de mezclas TERT-124 y TERT-146 para evaluar 14 muestras:

- Calcular el número total de pocillos:
  - 14 muestras en duplicado -> 28
  - NTC, Control Negativo y Control Positivo -> 3
  - $(28+3) + (0.05 * (28+3)) = 33$  pocillos
- De este modo, para el screening de 14 muestras, el volumen de cada reactivo debe ser multiplicado por 33 antes de ser agregado a la respectiva mezcla.

5. Agregue **9 µL** de cada **Mix** en el pocillo correspondiente según el diseño de la placa.
6. Agregue **1 µL** de **ADN a 25 ng/µL** (o hasta 2,5 µL si la concentración de ADN es < 25 ng/µL) en el pocillo correspondiente.
7. Agregue **1 µl** de TERT WT/control negativo (**TERT/FGFR3/KRAS-NC**) en los pocillos correspondientes.
8. Agregue **1 µL** de control positivo de mutación TERT-124 (**TERT\_124+**) en el pocillo correspondiente.
9. Agregue **1 µL** de control positivo de mutación TERT-146 (**TERT\_146+**) en el pocillo correspondiente.
10. Selle firmemente la placa de PCR de micropocillos antes de retirar la placa de la cámara/sala de PCR.
11. Centrifugue la placa PCR de micropocillos a 2000 g durante 5 segundos.
12. Inserte la placa de PCR de micropocillos en el equipo de PCR en tiempo real y ejecute el ensayo como se recomienda.

#### Notas

- Cambie los guantes según sea necesario para protegerse contra la contaminación de muestra a muestra y contra la contaminación del tubo de reacción de PCR externo
- Cambie la punta de la pipeta cada vez que el usuario pipetee muestras/controles en un pocillo diferente.
- La amplificación y la detección deben iniciarse inmediatamente después de sellar la placa de micropocillos/tubo de PCR o almacenarse a 4 °C durante un máximo de 1 hora protegido de la luz.

### 4.3. Interpretación y validación de los resultados

#### 4.3.1. Análisis de datos



MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA - M. N. 9483  
DT - TECNOLAB S. A.

#### **Importante**

Es posible que los valores de umbral deban ajustarse en función del rendimiento fluorescente individual de cada termociclador. Los ajustes que se presentan a continuación se definieron con el instrumento StepOnePlus™.

- Analice los datos en el software del instrumento de PCR en Tiempo Real usando los siguientes criterios:
  - Baseline: Auto.
  - Usar umbral (threshold) manual. Consulte la tabla a continuación para conocer los valores de umbral del canal.

Target	Reportero	Threshold (umbral)
TERT_124 Mut	FAM	500
TERT_124 WT	HEX/VIC	250
TERT_146 Mut	FAM	1000
TERT_146 WT	HEX/VIC	350



### 4.3.2. Validación de los resultados



#### i. Validar los resultados de mutaciones TERT -124

Una corrida de TERT-124 es válida **SOLAMENTE** cuando se obtiene, en las siguientes AMBAS tablas, “Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación-124 y si “No Template Control” no presenta amplificación.

- a) Control positivo de mutación TERT -124 (**TERT\_124+**) amplificado con reactivos de detección de mutaciones TERT -124:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Señal fluorescente HEX/VIC y FAM positiva	<b>Corrida Válida</b> (Amplificación correcta de ambos alelos WT y mutante).	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación -124.
Única señal fluorescente FAM positiva	<b>Corrida condicionada</b> (Anormal /No amplificación del alelo WT)	Compruebe si el alelo WT está amplificado en el ADN de la muestra: 1. si es positivo, proceder a la interpretación de resultados para la detección de la mutación -124. 2. si es negativo, repita la preparación de la placa y ejecute la detección de mutaciones -124.
Única señal fluorescente HEX/VIC positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Anormal/No amplificación del alelo mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -124.
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Anormal/No amplificación de ambos alelos WT y mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -124.

- b) Control negativo/TERT WT (**TERT/FGFR3/KRAS-NC**) amplificado con reactivos de detección de mutación TERT -124:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Única señal fluorescente HEX/VIC positiva	<b>Corrida Válida</b> (única amplificación del alelo WT)	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación -124.
Señal fluorescente HEX/VIC y FAM positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación incorrecta del alelo mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -124
Única señal fluorescente FAM positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación incorrecta del alelo mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -124
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Anormal/No amplificación de ambos alelos WT y mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -124

**ii. Validar los resultados de mutación TERT-146**

Una corrida de TERT-146 es válida **SOLAMENTE** cuando se obtiene, en las siguientes AMBAS tablas, “Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación-146” y si “No Template Control” no presenta amplificación.

- a) Control positivo de mutación TERT-146 (**TERT\_146+**) amplificado con los reactivos de detección de mutación TERT-146:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Señal fluorescente HEX/VIC y FAM positiva	<b>Corrida Válida</b> (amplificación correcta de ambos alelos WT y Mutante)	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación-146.
Única señal fluorescente FAM positiva	<b>Corrida condicionada</b> (Anormal /No amplificación del alelo WT)	Compruebe si el alelo WT está amplificado en el ADN de la muestra: 1. Si es positivo, proceder a la interpretación de resultados para la detección de la mutación -146. 2. Si es negativo, repita la preparación de la placa y ejecute la detección de mutaciones -1.
Única señal fluorescente HEX/VIC positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Anormal/No amplificación del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -146.
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Anormal/No amplificación de ambos alelos WT y mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -146.

- b) Control Negativo/TERT WT (**TERT/FGFR3/KRAS-NC**) amplificado con reactivo de detección de mutación TERT-146:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Única señal fluorescente HEX/VIC positiva	<b>Corrida Válida</b> (única amplificación del alelo WT)	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación -146.
Señal fluorescente HEX/VIC y FAM positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación incorrecta del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -146
Única señal fluorescente FAM positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación incorrecta del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -146
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Anormal/No amplificación de ambos alelos WT y mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -146

### 4.3.3. Interpretación de los resultados



#### **Importante**

a) Compruebe siempre los gráficos multicomponente y de amplificación (HEX/VIC y FAM) de cada muestra. El valor de Ct WT/CTRL/IC dependerá de la cantidad de ADN amplificable presente en la reacción y puede diferir entre muestras individuales debido a la fragmentación del ADN. El rango óptimo de Ct WT para este ensayo es 25-35.

b) Dado que las muestras pueden contener diferentes cantidades de células tumorales exfoliadas, los valores de Ct para las reacciones mutantes pueden variar mucho. Las muestras mutantes con un contenido de ADN tumoral más alto tendrán valores de Ct más bajos, mientras que las muestras mutantes con un contenido de ADN tumoral más bajo tendrán valores de Ct más altos.

c) Un resultado de "No se detectó ninguna mutación" no excluye la presencia de la mutación específica en la prueba para cada ensayo porque los resultados dependen del porcentaje de secuencias mutantes, la integridad adecuada de la muestra, la ausencia de inhibidores y suficiente ADN para ser detectado.

**Si se obtiene una Corrida Válida (ver 4.3.2),** analizar los resultados de acuerdo a las siguientes tablas:

a) Muestra de ADN amplificada con reactivos de detección TERT-124:

Multicomponente	Amplificación		Interpretación	Resultado
	HEX/VIC Ct	FAM Ct		
Única señal fluorescente Positiva HEX/VIC	$25 \leq Ct \leq 35$	Ninguno o $>38$	Mutación 124C>T TERTp No detectada ( <b>muestra Wildtype</b> )	La muestra es <b>NEGATIVA</b> para la prueba Uromonitor.
Señal fluorescente positiva HEX/VIC y FAM	$25 \leq C \leq 35$	$\leq 38$	Mutación 124C>T TERTp detectada - Heterocigota ( <b>Muestra mutada heterocigota</b> )	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor.
Única señal fluorescente Positiva FAM	Ninguno	$\leq 38$	Mutación 124C>T TERTp detectada – Homocigota ( <b>Muestra mutada homocigota</b> )	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor.
Señal fluorescente Positiva HEX/VIC y cualquier señal fluorescente FAM	$< 25$	Cualquiera	Reacción sobrecargada ( <b>Resultado Inválido</b> )	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con menos ADN.
Señal fluorescente Positiva FAM y señal débil HEX/VIC	$> 35$	Ninguno o $> 38$	Cantidad de ADN insuficiente ( <b>Resultado Inválido</b> )	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con más ADN.
Señal fluorescente no detectada	Ninguno	Ninguno	No se pueden obtener resultados ( <b>Resultado Inválido</b> )	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra.

b) Muestra de ADN amplificado con reactivos de detección TERT-146:

Multicomponente	Amplificación		Interpretación	Resultado
	Ct HEX/VIC	Ct FAM		
Única señal fluorescente Positiva HEX/VIC	$25 \leq Ct \leq 35$	Ninguno o $>38$	Mutación 146C>T TERTp No detectada* (muestra Wildtype)	La muestra es <b>NEGATIVA</b> para la prueba Uromonitor.
Señal fluorescente positiva HEX/VIC y FAM	$25 \leq Ct \leq 35$	$\leq 38$	Mutación 146C>T TERTp detectada - Heterocigota (Muestra mutada heterocigota)	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor.
Única señal fluorescente Positiva FAM	None	$\leq 38$	Mutación 146C>T TERTp detectada – Homocigota (Muestra mutada homocigota)	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor.
Señal fluorescente Positiva HEX/VIC y cualquier señal fluorescente FAM	$<25$	Cualquiera	Reacción sobrecargada (Resultado Inválido)	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con menos ADN.
Señal fluorescente Positiva FAM y señal débil HEX/VIC	$> 35$	Ninguno o $>38$	Cantidad de ADN insuficiente (Resultado Inválido)	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con más ADN.
Señal fluorescente no detectada	Ninguno	Ninguno	No se pueden obtener resultados (Resultado Inválido)	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra.

  
 MARISOL MASINO  
 BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.

## 5. Protocolo para la amplificación y detección de mutaciones de punto caliente de FGFR3.

Consulte el manual de uso del operador del instrumento de PCR en tiempo real para obtener instrucciones detalladas sobre la programación de los protocolos de amplificación FGFR3 248, FGFR3 249 y FGFR3 CTRL, con los siguientes pasos de flujo de trabajo.

### 5.1. Configuración del instrumento para mutaciones de punto caliente de FGFR3 248 y FGFR3 249 (todo en uno)

#### Instrumento StepOnePlus™

##### **Importante:**

*El protocolo detallado a continuación utiliza el software StepOne™. Otros equipos y/o softwares pueden requerir diferentes enfoques de configuración. Póngase en contacto con el soporte técnico de Uromonitor si necesita ayuda. Para garantizar un rendimiento de ensayo óptimo, asegúrese de que su instrumento esté calibrado para FAM.*

1. Cree un Nuevo experimento: File > New Experiment > Advanced Setup.

#### **Propiedades del experimento**

2. Ingrese el nombre del experimento y seleccione el instrumento StepOnePlus™ (96 pocillos).
3. Seleccione **Quantitation - Comparative CT ( $\Delta\Delta CT$ )** para el tipo de experimento.
4. Seleccione **TaqMan® Reagents** y **FAST** para el tipo de reactivos y velocidad de rampa, respectivamente.
5. Haga click en **Plate Setup** en el menú de navegación izquierdo.



#### **En la pestaña definir targets y muestras**

6. En la sección **Define Targets**, hacer click en **Add New Target** y configure los objetivos (targets) como se muestra en la tabla de abajo:

Target	Reportero	Quencher
FGFR3_248 Mut	FAM	ZEN-lowaBlack FQ
FGFR3_249 Mut	FAM	ZEN-lowaBlack FQ
FGFR3_CTRL	FAM	ZEN-lowaBlack FQ

7. En la sección **Define Samples**, hacer click en **Add New Sample** y agregar NTC para el control sin templado (no template control; agua), NC para control negativo (TERT/FGFR3/KRAS-NC), FGFR3\_248+ y FGFR3\_249+ para control positivo y los números/nombres de las muestras.

#### **En la pestaña asignar objetivos y muestras**

8. Asignar targets para seleccionar pocillos en la vista del diseño de la placa como se muestra abajo marcando las casillas de objetivos en la sección **Asignar objetivo(s)** a los pocillos seleccionados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	NTC FGFR3 248 Mix	NC FGFR3 248 Mix	FGFR3_ 248+ FGFR3 248 Mix		NTC FGFR3 249 Mix	NC FGFR3 249 Mix	FGFR3_ 249+ FGFR3 249 Mix		NTC FGFR3 CTRL Mix	NC FGFR3 CTRL Mix		
<b>B</b>	Sample 1 FGFR3 248 Mix	Sample 1 FGFR3 248 Mix	Sample 8 FGFR3 248 Mix	Sample 8 FGFR3 248 Mix	Sample 1 FGFR3 249 Mix	Sample 1 FGFR3 249 Mix	Sample 8 FGFR3 249 Mix	Sample 8 FGFR3 249 Mix	Sample 1 FGFR3 CTRL Mix		Sample 8 FGFR3 CTRL Mix	
<b>C</b>	Sample 2 FGFR3 248 Mix	Sample 2 FGFR3 248 Mix	Sample 9 FGFR3 248 Mix	Sample 9 FGFR3 248 Mix	Sample 2 FGFR3 249 Mix	Sample 2 FGFR3 249 Mix	Sample 9 FGFR3 249 Mix	Sample 9 FGFR3 249 Mix	Sample 2 FGFR3 CTRL Mix		Sample 9 FGFR3 CTRL Mix	
<b>D</b>	Sample 3 FGFR3 248 Mix	Sample 3 FGFR3 248 Mix	Sample 10 FGFR3 248 Mix	Sample 10 FGFR3 248 Mix	Sample 3 FGFR3 249 Mix	Sample 3 FGFR3 249 Mix	Sample 10 FGFR3 249 Mix	Sample 10 FGFR3 249 Mix	Sample 3 FGFR3 CTRL Mix		Sample 10 FGFR3 CTRL Mix	
<b>E</b>	Sample 4 FGFR3 248 Mix	Sample 4 FGFR3 248 Mix	Sample 11 FGFR3 248 Mix	Sample 11 FGFR3 248 Mix	Sample 4 FGFR3 249 Mix	Sample 4 FGFR3 249 Mix	Sample 11 FGFR3 249 Mix	Sample 11 FGFR3 249 Mix	Sample 4 FGFR3 CTRL Mix		Sample 11 FGFR3 CTRL Mix	
<b>F</b>	Sample 5 FGFR3 248 Mix	Sample 5 FGFR3 248 Mix	Sample 12 FGFR3 248 Mix	Sample 12 FGFR3 248 Mix	Sample 5 FGFR3 249 Mix	Sample 5 FGFR3 249 Mix	Sample 12 FGFR3 249 Mix	Sample 12 FGFR3 249 Mix	Sample 5 FGFR3 CTRL Mix		Sample 12 FGFR3 CTRL Mix	
<b>G</b>	Sample 6 FGFR3 248 Mix	Sample 6 FGFR3 248 Mix	Sample 13 FGFR3 248 Mix	Sample 13 FGFR3 248 Mix	Sample 6 FGFR3 249 Mix	Sample 6 FGFR3 249 Mix	Sample 13 FGFR3 249 Mix	Sample 13 FGFR3 249 Mix	Sample 6 FGFR3 CTRL Mix		Sample 13 FGFR3 CTRL Mix	
<b>H</b>	Sample 7 FGFR3 248 Mix	Sample 7 FGFR3 248 Mix	Sample 14 FGFR3 248 Mix	Sample 14 FGFR3 248 Mix	Sample 7 FGFR3 249 Mix	Sample 7 FGFR3 249 Mix	Sample 14 FGFR3 249 Mix	Sample 14 FGFR3 249 Mix	Sample 7 FGFR3 CTRL Mix		Sample 14 FGFR3 CTRL Mix	

9. Seleccione **None** (ninguno) en la sección **Select the dye** para usar como referencia pasiva.
10. En **View Plate Layout** (Vista del Diseño de la Placa), chequear la casilla **Enable VeriFlex™ Block**.
11. Hacer click en **Run Method** en el menú de navegación izquierdo para configurar los parámetros de ciclado enumerados abajo.



MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA, M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

### Ensayo de FGFR3 248/249

#### Programa de termiciclado (VeriFlex)

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	20 seg	45
Annealing	63°C (FGFR3 248) 65°C (FGFR3 249) 65°C (FGFR3 CTRL)	30 seg	
Extension*	72°C	20 seg	

\* *Recolección de datos*

12. Asegúrese de que la **Temperatura de Annealing** esté configurada correctamente para el bloque/objetivo correspondiente y que esté seleccionado **Data Collected On** para el paso de Annealing.

13. Ingrese 10 µL en el campo **Reaction Volume Per Well** (volumen de reacción por pocillo).
14. Guarde el experimento y proceda a la preparación de la placa.

## 5.2. Preparación de la placa FGFR3 248/249/CTRL (todo en uno)

1. Calcular el volumen necesario de cada reactivo para preparar mezclas FGFR3 248, FGFR 249 y FGFR3 CTRL, para las muestras que se están analizando.
2. En los cálculos incluya:
  - 2 replicados por muestra por mix.
  - 1 reacción extra para el NTC por cada mix.
  - 2 reacciones extras para los controles negativo y positivo para cada mix.
  - 5% más de volumen por errores de pipeteo.
3. Descongele todos los reactivos necesarios **en hielo** y mézclelos suavemente durante 3 a 5 segundos antes de usarlos.
4. Organice la distribución de la muestra de acuerdo con el diseño del paso "Configuración del instrumento" y prepare mezclas **FGFR3 248**, **FGFR 249** y **FGFR3 CTRL** respetando las siguientes cantidades:



FGFR3 248	
Reactivo	Volumen x pocillo
FGFR3_RMF	5 µL
FGFR3_RFA	1 µL
FGFR3_RFB	0.20 µL
FGFR3_R1-248	0.25 µL
FGFR3_R2-248	0.25 µL
H2O	2.30 µL
<b>Mix</b>	<b>9 µL</b>
DNA (25 ng/µL)	1 µL
<b>Volumen final</b>	<b>10 µL</b>

FGFR3 249	
Reactivo	Volumen x pocillo
FGFR3_RMF	5 µL
FGFR3_RFA	1 µL
FGFR3_RFB	0.20 µL
FGFR3_R1-249	0.25 µL
FGFR3_R2-249	0.25 µL
H2O	2.30 µL
<b>Mix</b>	<b>9 µL</b>
DNA (25 ng/µL)	1 µL
<b>Volumen final</b>	<b>10 µL</b>

FGFR3 CTRL	
Reactivo	Volumen x pocillo
FGFR3_RMF	5 µL
-	-
FGFR3_RFB	0.20 µL
FGFR3_R1-CTRL	0.25 µL
FGFR3_R2-CTRL	0.25 µL
H2O	3.30 µL
<b>Mix</b>	<b>9 µL</b>
DNA (25 ng/µL)	1 µL
<b>Volumen final</b>	<b>10 µL</b>

### Ejemplo

Preparación de mezclas FGFR3 248, FGFR3 249 y FGFR3 CTRL para evaluar 14 muestras:

- Calcular el N° total de pocillos necesarios para FGFR3 248 y FGFR3 249:
  - 14 muestras en duplicado -> 28
  - NTC, Controles Negativo y Positivo -> 3
  - $(28+3) + (0.05 * (28+3)) = 33$  pocillos
  - De este modo, para evaluar 14 muestras, el volumen de cada reactivo debe ser multiplicado por 33 antes de ser adicionado a la respectiva mezcla (mix).
- Calcular el N° total de pocillos necesarios para FGFR3 CTRL:
  - 14 muestras -> 14
  - NTC y Control Negativo -> 2
  - $(14+2) + (0.05 * (14+2)) = 17$  pocillos
  - De este modo, para evaluar 14 muestras, el volumen de cada reactivo debe ser multiplicado por 17 antes de ser adicionado a la mezcla (mix) FGFR3 CTRL.

5. Agregue **9 µL** de cada **Mix** en el pocillo correspondiente según el diseño de la placa.
6. Agregue **1 µL** de **ADN a 25 ng/µL** (o hasta 2,5 µL si la concentración de ADN es < 25 ng/µL) en el pocillo correspondiente.
7. Agregue **1 µl** de control negativo de mutación FGFR3 (**TERT/FGFR3/KRAS-NC**) en los pocillos correspondientes.
8. Agregue **1 µL** de control positivo de mutación FGFR3 248 (**FGFR3\_248+**) en el pocillo correspondiente.
9. Agregue **1 µL** de control positivo de mutación FGFR3 249 (**FGFR3\_249+**) en el pocillo correspondiente.
10. Selle firmemente la placa de PCR de micropocillos antes de retirar la placa de la cámara/sala de PCR.
11. Centrifugue la placa PCR de micropocillos a 2000 g durante 5 segundos.
12. Inserte la placa de PCR de micropocillos en el equipo de PCR en tiempo real y ejecute el ensayo como se recomienda.

### Notas

- Cambie los guantes según sea necesario para protegerse contra la contaminación de muestra a muestra y contra la contaminación externa del tubo de reacción de PCR.
- Cambie la punta de la pipeta cada vez que el usuario pipetee muestras/controles en un pocillo diferente.
- La amplificación y la detección deben iniciarse inmediatamente después de sellar la placa de micropocillos/tubo de PCR o almacenarse a 4 °C durante un máximo de 1 hora protegido de la luz.



### 5.3. Interpretación y validación de los resultados



#### 5.3.1. Análisis de datos

##### **Importante**

Es posible que los valores de umbral deban ajustarse en función del rendimiento fluorescente individual de cada termociclador. Los ajustes que se presentan a continuación se definieron con el instrumento StepOnePlus™.

- Analice los datos en el software del instrumento de PCR en Tiempo Real usando los siguientes criterios:
  - Baseline: Auto.
  - Usar umbral (threshold) manual. Consulte la tabla a continuación para conocer los valores de umbral del canal.

Target	Reportero	Threshold
FGFR3_248 Mut	FAM	1000
FGFR3_249 Mut	FAM	1000
FGFR3_CTRL	FAM	1000

#### 5.3.2. Validación de los resultados

##### i. **Validación de los resultados de la mutación FGFR3 248**

Una corrida FGFR3 248 es válida **ÚNICAMENTE** cuando se obtiene en las siguientes tablas (ambas), un “proceder con la interpretación de resultados para la detección de mutaciones 248” y el control sin templado (“No Template Control”) no presenta amplificación.

- a) Control positivo para la mutación FGFR3 248 (**FGFR3\_248+**) amplificado con los reactivos de detección de mutación FGFR3 248:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Señal fluorescente positiva FAM en el ensayo FGFR3 248	<b>Corrida válida</b> (amplificación correcta del alelo Mutante)	Proceder con la interpretación de los resultados para la detección de la mutación 248
Señal fluorescente No detectada	<b>Corrida inválida</b> (Anormal/No amplificación del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de la mutación 248

- b) Control Negativo/FGFR3 WT (**TERT/FGFR3/KRAS-NC**) amplificado con reactivos de detección de FGFR3 248 y FGFR3 CTRL.

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Señal fluorescente negativa FAM en el ensayo FGFR3 248 y positiva en el ensayo FGFR3 CTRL	<b>Corrida Válida</b> (Amplificación del alelo WT únicamente)	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación -248.
Señal fluorescente positiva FAM en el ensayo FGFR3 248 y positiva en el ensayo FGFR3 CTRL	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación – 248.
Señal fluorescente positiva FAM en el ensayo FGFR3 248 y negativo en el ensayo FGFR3 CTRL	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación – 248.
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Anormal/No amplificación de ambos alelos WT y mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación – 248.

MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

ii. **Validación de los resultados de mutación de FGFR3 249**

Una corrida de FGFR3 249 es válida **SOLO** cuando se obtiene, en las siguientes dos tablas, “**Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación -249**” y si el control sin templado, “**No Template Control**”, no presenta amplificación.

- a) Control positivo de mutación de FGFR3 249 (**FGFR3\_249+**) amplificado con reactivos de mutación FGFR3 249:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Señal fluorescente positiva FAM en el ensayo FGFR3 249	<b>Corrida Válida</b> (Amplificación correcta de alelo Mutante)	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación -249.
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal o sin amplificación del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -249.

- b) Control negativo/FGFR3 WT (**TERT/FGFR3/KRAS-NC**) amplificado con reactivos de detección de mutación FGFR3 249 y FGFR3 CTRL:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Señal fluorescente negativa FAM en la prueba FGFR3 249 y positiva en la prueba FGFR3 CTRL.	<b>Valid Run</b> (Amplificación solo del alelo Mutante)	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación -249.

Señal fluorescente positiva FAM en la prueba FGFR3 249 y en la prueba FGFR3CTRL.	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal de alelo mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -249
Señal fluorescente positiva FAM en la prueba FGFR3 249 y negativo en FGFR3 CTRL.	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal de alelo mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -249
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal o sin amplificación de ambos alelos, Mutante y WT)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación -249

### 5.3.3. Interpretación de los resultados



#### **Importante**

a) Compruebe siempre los gráficos multicomponente y de amplificación (FAM) de cada muestra. El valor de Ct WT/CTRL/IC dependerá de la cantidad de ADN amplificable presente en la reacción y puede diferir entre muestras individuales debido a la fragmentación del ADN. El rango óptimo de Ct CTRL para este ensayo es 25-35.

b) Dado que las muestras pueden contener diferentes cantidades de células tumorales exfoliadas, los valores de Ct para las reacciones mutantes pueden variar mucho. Las muestras mutantes con un contenido de ADN tumoral más alto tendrán valores de Ct más bajos, mientras que las muestras mutantes con un contenido de ADN tumoral más bajo tendrán valores de Ct más altos.

c) Un resultado de "No se detectó ninguna mutación" no excluye la presencia de la mutación específica en la prueba para cada ensayo porque los resultados dependen del porcentaje de secuencias mutantes, la integridad adecuada de la muestra, la ausencia de inhibidores y suficiente ADN para ser detectado.

**Si se obtiene una corrida válida (ver 5.3.2), analizar los resultados de acuerdo a las siguientes tablas:**

a) Muestra de ADN amplificado con reactivos de detección FGFR3 248:

Multicomponente	Amplificación		Interpretación	Resultado
	FAM Ct (CTRL)	FAM Ct (248)		
Señal fluorescente positiva FAM solo en el ensayo FGFR3 CTRL	$25 \leq Ct \leq 35$	Ninguno o $>38$	No se detecta mutación FGFR3 codon248 <b>(Muestra Wildtype)</b>	La muestra es <b>NEGATIVA</b> para la prueba Uromonitor
Señal fluorescente positiva FAM en el ensayo FGFR3 CTRL y en el ensayo FGFR3 248	$25 \leq C \leq 35$	$\leq 38$	Mutación FGFR3 p.R248C detectada, heterocigota <b>(Muestra Mutada Heterocigota)</b>	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor.

Señal fluorescente positiva FAM solo en el ensayo FGFR3 248	Ninguno	$\leq 38$	Mutación FGFR3 p.R248C Detectada – homocigota ( <b>Muestra mutada homocigota</b> )	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor.
Señal fluorescente positiva FAM exacerbada en el ensayo FGFR3 CTRL y cualquier señal fluorescente FAM en el ensayo FGFR3 248	< 25	Cualquiera	Reacción sobrecargada ( <b>Resultado Inválido</b> )	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con menos ADN.
Señal fluorescente positiva débil FAM en el ensayo FGFR3 CTRL y en el ensayo FGFR3 248	> 35	Ninguno o >38	Cantidad de ADN insuficiente ( <b>Resultado Inválido</b> )	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con más ADN.
Señal fluorescente no detectada	Ninguno	Ninguno	No se pueden obtener resultados ( <b>Resultado Inválido</b> )	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra.



MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

b) Muestra de ADN amplificado con reactivos de detección de FGFR3 249:

Multicomponente	Amplificación		Interpretación	Resultado
	FAM Ct (CTRL)	FAM Ct (249)		
Señal fluorescente positiva FAM solo en el ensayo FGFR3 CTRL	$25 \leq Ct \leq 35$	Ninguno o $>38$	Mutación FGFR3 codon249 no detectada <b>(muestra Wildtype)</b>	La muestra es <b>NEGATIVA</b> para la prueba Uromonitor
Señal fluorescente positiva FAM en el ensayo FGFR3 CTRL y en el ensayo FGFR3 249	$25 \leq Ct \leq 35$	$\leq 38$	Mutación FGFR3p.S249C Detectada – heterocigota <b>(Muestra mutada heterocigota)</b>	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor
Señal fluorescente positiva FAM solo en el ensayo FGFR3 249	Ninguno	$\leq 38$	Mutación FGFR3 p.S249C Detectada - homocigota <b>(Muestra mutada homocigota)</b>	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor
Señal fluorescente positiva FAM exacerbada en el ensayo FGFR3 CTRL y cualquier señal fluorescente FAM en el ensayo FGFR3 249	$<25$	Cualquiera	Reacción sobrecargada <b>(Resultado Inválido)</b>	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con menos ADN
Señal fluorescente positiva débil FAM en el ensayo FGFR3 CTRL y en el ensayo FGFR3 249	$>35$	Ninguno o $> 38$	Cantidad de ADN insuficiente <b>(Resultado Inválido)</b>	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con más ADN.
Señal fluorescente no detectada	Ninguno	Ninguno	No se pueden obtener resultados <b>(Resultado Inválido)</b>	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra.



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

## 6. Protocolo para la amplificación y detección de mutaciones de punto caliente de KRAS

Consulte el manual de uso del operador del instrumento de PCR en tiempo real para obtener instrucciones detalladas sobre la programación de los protocolos de amplificación KRAS G12X/13X y KRAS Q61X, con los siguientes pasos de flujo de trabajo.

### 6.1. Configuración del instrumento para mutaciones de puntos calientes de KRAS G12X/13X y KRAS Q61X (todo en uno)

#### Instrumento StepOnePlus™

##### **Importante:**

El protocolo detallado a continuación utiliza el software StepOne™. Otros equipos y/o softwares pueden requerir diferentes enfoques de configuración. Póngase en contacto con el soporte técnico de Uromonitor si necesita ayuda. Para garantizar un rendimiento de ensayo óptimo, asegúrese de que su instrumento esté calibrado para FAM y HEX/VIC.

1. Cree un Nuevo experimento: File > New Experiment > Advanced Setup.



#### **En Propiedades del experimento**

2. Ingrese el nombre del experimento y seleccione el instrumento StepOnePlus™ (96 pocillos).
3. Seleccione **Quantitation - Comparative C<sub>T</sub> (ΔΔC<sub>T</sub>)** para el tipo de experimento.
4. Seleccione **TaqMan® Reagents** y **FAST** para tipo de reactivos y velocidad de rampa, respectivamente.
5. Haga click en **Plate Setup** en el menú de navegación izquierdo.

#### **En pestaña Definir objetivos y muestras**

6. En la sección **Definir Targets**, hacer click en **Add New Target** y configurar los targets como se muestra en la tabla de abajo:

Target	Reportero	Quencher
KRAS_G12X/13X Mut	FAM	ZEN-lowaBlack FQ
KRAS_G12X/13X IC	HEX/VIC	ZEN-lowaBlack FQ
KRAS_Q61X Mut	FAM	ZEN-lowaBlack FQ
KRAS_Q61X IC	HEX/VIC	ZEN-lowaBlack FQ

7. En la sección **Define Samples**, hacer click en **Add New Sample** y agregar NTC para control sin molde, o no template control (agua), NC para control negativo (TERT/FGFR3/KRAS-NC), KRAS\_All+ para controles positivos y el número/nombres de las muestras.

#### **En la pestaña asignar Targets y muestras**

8. Asignar objetivos (targets) para seleccionar pocillos en la vista del diseño de la placa como se muestra abajo marcando las casillas de objetivos en la sección **Asignar objetivo(s) a los pocillos seleccionados**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC KRAS G12X/13X Mix	NC KRAS G12X/13X Mix	KRASAI+ KRAS G12X/13X Mix		Sample 15 KRAS G12X/13X Mix	Sample 15 KRAS G12X/13X Mix	NTC KRAS Q61X Mix	NC KRAS Q61X Mix	KRASAI+ KRAS Q61X Mix		Sample 15 KRAS Q61X Mix	Sample 15 KRAS Q61X Mix
B	Sample 1 KRAS G12X/13X Mix	Sample 1 KRAS G12X/13X Mix	Sample 8 KRAS G12X/13X Mix	Sample 8 KRAS G12X/13X Mix	Sample 16 KRAS G12X/13X Mix	Sample 16 KRAS G12X/13X Mix	Sample 1 KRAS Q61X Mix	Sample 1 KRAS Q61X Mix	Sample 8 KRAS Q61X Mix	Sample 8 KRAS Q61X Mix	Sample 16 KRAS Q61X Mix	Sample 16 KRAS Q61X Mix
C	Sample 2 KRAS G12X/13X Mix	Sample 2 KRAS G12X/13X Mix	Sample 9 KRAS G12X/13X Mix	Sample 9 KRAS G12X/13X Mix	Sample 17 KRAS G12X/13X Mix	Sample 17 KRAS G12X/13X Mix	Sample 2 KRAS Q61X Mix	Sample 2 KRAS Q61X Mix	Sample 9 KRAS Q61X Mix	Sample 9 KRAS Q61X Mix	Sample 17 KRAS Q61X Mix	Sample 17 KRAS Q61X Mix
D	Sample 3 KRAS G12X/13X Mix	Sample 3 KRAS G12X/13X Mix	Sample 10 KRAS G12X/13X Mix	Sample 10 KRAS G12X/13X Mix	Sample 18 KRAS G12X/13X Mix	Sample 18 KRAS G12X/13X Mix	Sample 3 KRAS Q61X Mix	Sample 3 KRAS Q61X Mix	Sample 10 KRAS Q61X Mix	Sample 10 KRAS Q61X Mix	Sample 18 KRAS Q61X Mix	Sample 18 KRAS Q61X Mix
E	Sample 4 KRAS G12X/13X Mix	Sample 4 KRAS G12X/13X Mix	Sample 11 KRAS G12X/13X Mix	Sample 11 KRAS G12X/13X Mix	Sample 19 KRAS G12X/13X Mix	Sample 19 KRAS G12X/13X Mix	Sample 4 KRAS Q61X Mix	Sample 4 KRAS Q61X Mix	Sample 11 KRAS Q61X Mix	Sample 11 KRAS Q61X Mix	Sample 19 KRAS Q61X Mix	Sample 19 KRAS Q61X Mix
F	Sample 5 KRAS G12X/13X Mix	Sample 5 KRAS G12X/13X Mix	Sample 12 KRAS G12X/13X Mix	Sample 12 KRAS G12X/13X Mix	Sample 20 KRAS G12X/13X Mix	Sample 20 KRAS G12X/13X Mix	Sample 5 KRAS Q61X Mix	Sample 5 KRAS Q61X Mix	Sample 12 KRAS Q61X Mix	Sample 12 KRAS Q61X Mix	Sample 20 KRAS Q61X Mix	Sample 20 KRAS Q61X Mix
G	Sample 6 KRAS G12X/13X Mix	Sample 6 KRAS G12X/13X Mix	Sample 13 KRAS G12X/13X Mix	Sample 13 KRAS G12X/13X Mix	Sample 21 KRAS G12X/13X Mix	Sample 21 KRAS G12X/13X Mix	Sample 6 KRAS Q61X Mix	Sample 6 KRAS Q61X Mix	Sample 13 KRAS Q61X Mix	Sample 13 KRAS Q61X Mix	Sample 21 KRAS Q61X Mix	Sample 21 KRAS Q61X Mix
H	Sample 7 KRAS G12X/13X Mix	Sample 7 KRAS G12X/13X Mix	Sample 14 KRAS G12X/13X Mix	Sample 14 KRAS G12X/13X Mix	Sample 22 KRAS G12X/13X Mix	Sample 22 KRAS G12X/13X Mix	Sample 7 KRAS Q61X Mix	Sample 7 KRAS Q61X Mix	Sample 14 KRAS Q61X Mix	Sample 14 KRAS Q61X Mix	Sample 22 KRAS Q61X Mix	Sample 22 KRAS Q61X Mix

9. Seleccione **None** (ninguno) en la sección **Select the dye** para usarla como **referencia pasiva**.

10. Hacer click en **Run Method** en el menú de navegación izquierdo para configurar los parámetros de ciclado enumerados abajo.

### Ensavo KRAS G12X/13X y ensavo Q61X



#### Programa de termociclado

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	20 sec	45
Annealing	62°C	30 sec	
Extensión*	72°C	20 sec	

\* Recolectar datos

11. Asegúrese de que la **Temperatura de Annealing** esté configurada correctamente y que sea seleccionado **Data Collected On** en el **paso de extensión**.

12. Ingrese 10 µL en el campo **Reaction Volume Per Well** (volumen de reacción por pocillo).

13. Guarde el experimento y proceda a la preparación de la placa.

## 6.2. Preparación de la placa KRAS G12X/13X y KRAS Q61X (todo en uno)

1. Calcular el volumen de cada reactivo para preparar las mezclas (mixes) G12X/13X y KRAS Q61X, necesarias para las muestras que se están analizando.
2. En los cálculos incluya:
  - 2 replicados por muestra por mezcla (mix).
  - 1 reacción extra para el NTC por cada mix.
  - 2 reacciones extras para los controles negativo y positivo para cada mix.
  - 5% más de volumen por errores de pipeteo.
3. Descongele todos los reactivos necesarios **en hielo** y mézclelos suavemente durante 3 a 5 segundos antes de usarlos.
4. Organice la distribución de la muestra de acuerdo con el diseño del paso "Configuración del instrumento" y prepare las **Mixes KRAS G12X/13X y KRAS Q61X** respetando las siguientes cantidades:



KRAS G12X/13X	
Reactivo	Volumen por pocillo
KRAS_RMK	5 µL
KRAS_RKA-12/13	0.45 µL
KRAS_RKB-12/13	0.45 µL
KRAS_R1-12/13	0.25 µL
KRAS_R2-12/13	0.20 µL
H2O	2.65 µL
<b>Mix</b>	<b>9 µL</b>
<b>DNA (25 ng/µL)</b>	<b>1 µL</b>
<b>Volumen final</b>	<b>10 µL</b>

KRAS Q61X	
Reactivo	Volumen por pocillo
KRAS_RMK	5 µL
KRAS_RKA-61	0.45 µL
KRAS_RKB-61	0.45 µL
KRAS_R1-61	0.25 µL
KRAS_R2-61	0.20 µL
H2O	2.65 µL
<b>Mix</b>	<b>9 µL</b>
<b>DNA (25 ng/µL)</b>	<b>1 µL</b>
<b>Volumen final</b>	<b>10 µL</b>

### Example

Preparación de las mezclas KRAS G12X/13X y KRAS Q61X para evaluar 14 muestras:

- Calcular el número total de pocillos:
  - 14 muestras en duplicado -> 28
  - NTC, Control Negativo y Control Positivo -> 3
  - $(28+3) + (0.05 * (28+3)) = 33$  pocillos
- De este modo, para el screening de 14 muestras, el volumen de cada reactivo debe ser multiplicado por 33 antes de ser agregado a la respectiva mezcla

5. Agregue **9 µL** de cada **Mix** en el pocillo correspondiente según el diseño de la placa.
6. Agregue **1 µL** de **ADN a 25 ng/µL** (o hasta 2,5 µL si la concentración de ADN es < 25 ng/µL) en el pocillo correspondiente.



7. Agregue **1 µl** de Control Negativo KRAS (**TERT/FGFR3/KRAS-NC**) en los pocillos correspondientes de ambos objetivos (KRAS G12X/13X y KRAS Q61X).
8. Agregue **1 µL** de Control Positivo KRAS (**KRAS\_AII+**) en el pocillo correspondiente de ambos objetivos (KRAS G12X/13X y KRAS Q61X).
9. Selle firmemente la placa de PCR de micropocillos antes de retirar la placa de la cámara/sala de PCR.
10. Centrifugue la placa PCR de micropocillos a 2000 g durante 5 segundos.
11. Inserte la placa de PCR de micropocillos en el equipo de PCR en tiempo real y ejecute el ensayo como se recomienda.

### Notas

- Cambie los guantes según sea necesario para protegerse contra la contaminación de muestra a muestra y contra la contaminación externa del tubo de reacción de PCR.
- Cambie la punta de la pipeta cada vez que el usuario pipetee muestras/controles en un pocillo diferente.
- La amplificación y la detección deben iniciarse inmediatamente después de sellar la placa de micropocillos/tubo de PCR o almacenarse a 4 °C durante un máximo de 1 hora

## 6.3. Interpretación y validación de los resultados

### 6.3.1. Análisis de datos

#### **Importante**

*Es posible que los valores de umbral deban ajustarse en función del rendimiento fluorescente individual de cada termociclador. Los ajustes que se presentan a continuación se definieron con el instrumento StepOnePlus™.*

- Analice los datos en el software del instrumento de PCR en Tiempo Real usando los siguientes criterios:
  - Baseline: Auto.
  - Usar umbral (threshold) manual. Consulte la tabla a continuación para conocer los valores de umbral del canal

Target	Reportero	Threshold (umbral)
KRAS_G12X/13X Mut	FAM	2000
KRAS_G12X/13X IC	HEX/VIC	350
KRAS_Q61X Mut	FAM	2000
KRAS_Q61X IC	HEX/VIC	350



### 6.3.2. Validación de los resultados

#### i. Validar los resultados de mutación KRAS G12X/13X

Una corrida KRAS G12X/13X es válida **SOLO** cuando se obtiene, en las siguientes dos tablas, “**Proceder con la interpretación de resultados de la detección de la mutación- G12X/13X**” y si “**No Template Control**” no presenta amplificación.

- a) Control Positivo de KRAS G12X/13X (**KRAS\_All+**) amplificado con reactivos de detección de mutación KRAS G12X/13X:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Señal fluorescente HEX/VIC y FAM positiva	<b>Valid Run</b> (Amplificación correcta de ambos alelos IC y Mutante).	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación G12X/13X
Única señal fluorescente FAM positiva	<b>Corrida condicionada</b> (Amplificación anormal o No amplificación del alelo IC)	Compruebe si el alelo IC está amplificado en el ADN de la muestra: 1. Si es positivo, proceder a la interpretación de resultados para la detección de la mutación - G12X/13X. 2. Si es negativo, repita la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutaciones - G12X/13X.
Única señal fluorescente HEX/VIC positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal o No amplificación del alelo mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación G12X/13X
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal o No amplificación de ambos alelos IC y mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación G12X/13X



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

- b) Control Negativo KRAS (**TERT/FGFR3/KRAS-NC**) amplificado con reactivos de detección de mutaciones de KRAS G12X/13X:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Única señal fluorescente HEX/VIC positiva	<b>Corrida Válida</b> (única amplificación del alelo IC)	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación G12X/13X
Señal fluorescente HEX/VIC y FAM positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación incorrecta del alelo mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación G12X/13X.
Única señal fluorescente FAM positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación incorrecta del alelo mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación G12X/13X.
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal/No amplificación de ambos alelos IC y mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación G12X/13X.

ii. **Validar los resultados de mutación KRAS Q61X**

Una corrida de KRAS Q61X es válida **SOLO** cuando se obtiene, en las siguientes dos tablas, “**Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación Q61X**” y si “**No Template Control**” no presenta amplificación.

- c) Control Positivo KRAS Q61X (**KRAS\_AII+**) amplificado con reactivos de detección de mutación KRAS Q61X:  
d)

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Señal fluorescente HEX/VIC y FAM positiva	<b>Corrida Válida</b> (amplificación correcta de ambos alelos IC y Mutante)	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación Q61X
Única señal fluorescente FAM positiva	<b>Corrida condicionada</b> (Amplificación anormal /No amplificación del alelo IC)	Compruebe si el alelo IC está amplificado en el ADN de la muestra: 1. Si es positivo, proceder a la interpretación de resultados para la detección de la mutación Q61X. 2. Si es negativo, repita la preparación de la placa y ejecute la detección de mutaciones Q61X.
Única señal fluorescente HEX/VIC positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal/No amplificación del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación Q61X




MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal/No amplificación de ambos alelos IC y mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación Q61X
----------------------------------	--	--

- e) Control Negativo KRAS (**TERT/FGFR3/KRAS-NC**) amplificado con reactivo de detección de mutación KRAS Q61X:

Resultado	Validación de la corrida	Siguiente procedimiento
Única señal fluorescente HEX/VIC positiva	<b>Corrida Válida</b> (única amplificación del alelo IC)	Proceder con la interpretación de resultados para la detección de la mutación Q61X
Señal fluorescente HEX/VIC y FAM positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación incorrecta del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación Q61X
Única señal fluorescente FAM positiva	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación incorrecta del alelo Mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación Q61X
Sin señal fluorescente detectada	<b>Corrida Inválida</b> (Amplificación anormal/No amplificación de ambos alelos IC y mutante)	Repetir la preparación de la placa y la corrida para la detección de mutación Q61X

### 6.3.3 Interpretación de resultados



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - M. N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

#### **Importante**

a) Compruebe siempre los gráficos multicomponente y de amplificación (HEX/VIC y FAM) de cada muestra. El valor de Ct WT/CTRL/IC dependerá de la cantidad de ADN amplificable presente en la reacción y puede diferir entre muestras individuales debido a la fragmentación del ADN. El rango óptimo de Ct WT para este ensayo es 25-35.

b) Dado que las muestras pueden contener diferentes cantidades de células tumorales exfoliadas, los valores de Ct para las reacciones mutantes pueden variar mucho. Las muestras mutantes con un contenido de ADN tumoral más alto tendrán valores de Ct más bajos, mientras que las muestras mutantes con un contenido de ADN tumoral más bajo tendrán valores de Ct más altos.

c) Un resultado de "No se detectó ninguna mutación" no excluye la presencia de la mutación específica en la prueba para cada ensayo porque los resultados dependen del porcentaje de secuencias mutantes, la integridad adecuada de la muestra, la ausencia de inhibidores y suficiente ADN para ser detectado.

Si se obtiene una corrida Válida (ver 6.3.2), analizar los resultados de acuerdo a las siguientes tablas:

a) Muestra de ADN amplificada con reactivos de detección KRAS G12X/13X:

Multicomponente	Amplificación		Interpretación	Resultado
	HEX/VIC Ct	FAM Ct		
Única señal fluorescente Positiva HEX/VIC	$25 \leq Ct \leq 35$	Ninguno o $>40$	Mutación KRAS G12X/13X No detectada <b>(Muestra Wildtype)</b>	La muestra es <b>NEGATIVA</b> para la prueba Uromonitor.
Señal fluorescente positiva HEX/VIC y FAM	$25 \leq C \leq 35$	$\leq 40$	Mutación KRAS G12X/13X Detectada <b>(Muestra Mutada)</b>	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor
Señal fluorescente Positiva HEX/VIC y cualquier señal fluorescente FAM	$< 25$	Cualquiera	Reacción sobrecargada <b>(Resultado Inválido)</b>	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con menos ADN.
Señal fluorescente Positiva FAM y señal débil HEX/VIC	$> 35$	Ninguno o $>40$	Cantidad de ADN insuficiente <b>(Resultado Inválido)</b>	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con más ADN.
Señal fluorescente no detectada	Ninguno	Ninguno	No se pueden obtener resultados <b>(Resultado Inválido)</b>	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra.



MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

## b) Muestra de ADN amplificado con reactivos de KRAS Q61X:

Multicomponente	Amplificación		Interpretación	Resultado
	HEX/VIC Ct	FAM Ct		
Única señal fluorescente Positiva HEX/VIC	$25 \leq Ct \leq 35$	Ninguno o $>40$	Mutación KRAS Q61X NO detectada <b>(Muestra Wildtype)</b>	La muestra es <b>NEGATIVA</b> para la prueba Uromonitor.
HEX/VIC and FAM positive fluorescent signal	$25 \leq C \leq 35$	$\leq 40$	Mutación KRAS Q61X detectada <b>(Muestra mutada)</b>	La muestra es <b>POSITIVA</b> para la prueba Uromonitor
Señal fluorescente Positiva HEX/VIC y cualquier señal fluorescente FAM	$< 25$	Cualquiera	Reacción sobrecargada <b>(Resultado Inválido)</b>	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con menos ADN.
Señal fluorescente Positiva FAM y señal débil HEX/VIC	$> 35$	Ninguno o $>40$	Cantidad de ADN insuficiente <b>(Resultado Inválido)</b>	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra con más ADN.
Señal fluorescente no detectada	Ninguno	Ninguno	No se pueden obtener resultados <b>(Resultado Inválido)</b>	<b>Inválido.</b> Repetir la corrida en esta muestra.



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - M. N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

## 7. Re-testeo de muestras con resultados inválidos

1. Repetir el protocolo para la amplificación comenzando desde “**Plate preparation**” con las siguientes modificaciones:
  - Duplique la cantidad de ADN usada en la amplificación previa hasta un máximo de 4 µL de muestra de ADN.
  - Reduzca el H<sub>2</sub>O en la mezcla en 2 µL por muestra del protocolo original.
  - Cuando distribuya las mezclas por pocillo de la microplaca, reduzca el volumen distribuido a 7 µL.
2. Continúe el resto del procedimiento.

### Nota

Si, luego del re-testeo, la muestra resulta nuevamente inválida o no hubo suficiente cantidad/calidad de ADN en la muestra aislada, repetir el procedimiento por completo para esa muestra, comenzando desde la “Extracción de ADN” con una nueva muestra recolectada desde el paciente.

## 8. Precauciones del procedimiento

Como con cualquier procedimiento de prueba, las buenas prácticas de laboratorio son esenciales para el desempeño adecuado de este ensayo. Debido a la alta sensibilidad analítica de esta prueba, se debe tener cuidado de mantener los reactivos y las mezclas de amplificación libres de contaminación.



MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

## 9. Limitaciones del procedimiento

1. La prueba **Uromonitor® de mutación TERTp/FGFR3/KRAS** solo ha sido validada para su uso con muestras de orina humana.
2. La prueba **Uromonitor® de mutación TERTp/FGFR3/KRAS** solo se ha validado con el Uromonitor® - Kit de preparación y extracción de ADN.
3. La detección de una mutación depende del número de copias presentes en la muestra y puede verse afectada por la integridad de la muestra, la cantidad de ADN aislado y la presencia de sustancias que interfieren.
4. Los resultados confiables dependen del muestreo, la filtración, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento adecuados de las muestras. Siga los procedimientos descritos anteriormente en este documento.
5. El uso de este producto debe limitarse al personal capacitado en las técnicas de PCR y el uso de máquinas y software de PCR en tiempo real reconocidos y validados.
6. No se han evaluado los efectos de otras posibles variables, como el aislamiento del ADN de la muestra mediante diferentes métodos.

7. Aunque son raras, las mutaciones dentro de las regiones del ADN genómico de los genes TERT, FGFR3 y KRAS cubiertas por los cebadores y/o las sondas de la prueba de mutación Uromonitor® TERTp/FGFR3/KRAS pueden hacer que no se detecte la presencia de una mutación. Las muestras con resultados notificados como "Sin mutación detectada" pueden albergar otras mutaciones de TERT/FGFR3/KRAS no detectadas por el ensayo.
8. La presencia de inhibidores de la PCR en las muestras puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
9. Aunque es raro (<0,2 %), algunas mutaciones complejas y múltiples de la región promotora de TERT pueden hacer que no se detecte la presencia de una mutación (resultados de "No se detectó ninguna mutación").
10. Se validó el uso de la prueba de mutación Uromonitor® TERTp/FGFR3/KRAS con 25 ng de ADN por reacción/pocillo. No se recomiendan cantidades de entrada de ADN inferiores a 25 ng por reacción/pocillo ni superiores a 75 ng por reacción/pocillo.
11. La prueba de mutación Uromonitor® TERTp/FGFR3/KRAS es una prueba cualitativa. La prueba no es para mediciones cuantitativas del porcentaje de mutación.
12. Debe seguirse el procedimiento descrito anteriormente para detectar ~7 % de secuencias mutantes en un fondo de ADN de tipo salvaje para las mutaciones del promotor TERT c.1-124C>T y c.1-146C>T.
13. Se debe seguir el procedimiento descrito anteriormente para detectar ~7 % de secuencias mutantes en un fondo de ADN de tipo salvaje para las mutaciones R248C y S249C del punto crítico de FGFR3.
14. Se debe seguir el procedimiento descrito anteriormente para detectar aproximadamente el 7 % de las secuencias mutantes en un fondo de ADN de tipo salvaje para las mutaciones del punto crítico de KRAS.

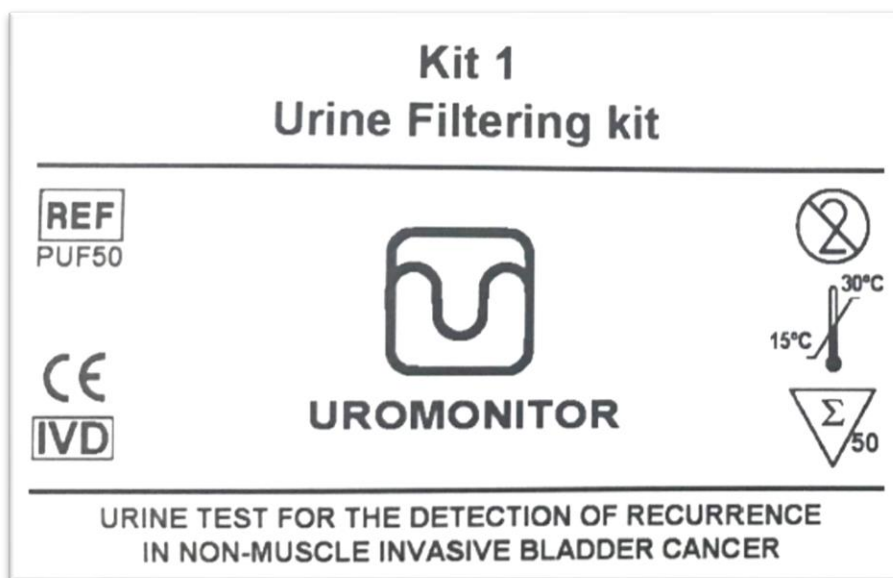


MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.



**PROYECTO DE RÓTULOS EXTERNOS - UROMONITOR**

**KIT 1 – URINE FILTERING KIT** (Referencia: PUF50)



**IMPORTADOR:** TECNO LAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Argentina. Teléfono: 54-11- 4-555-0010.

**DIRECTOR TECNICO:** Bioq. Marisol Masino.

**ORIGEN DE ELABORACION:** Infogene. Lda (IPN Edificio D, Rua Pedro Nunes, 3030-199, Coimbra, Portugal)

Venta a Laboratorios de Análisis Clínicos – Uso Profesional Exclusivo

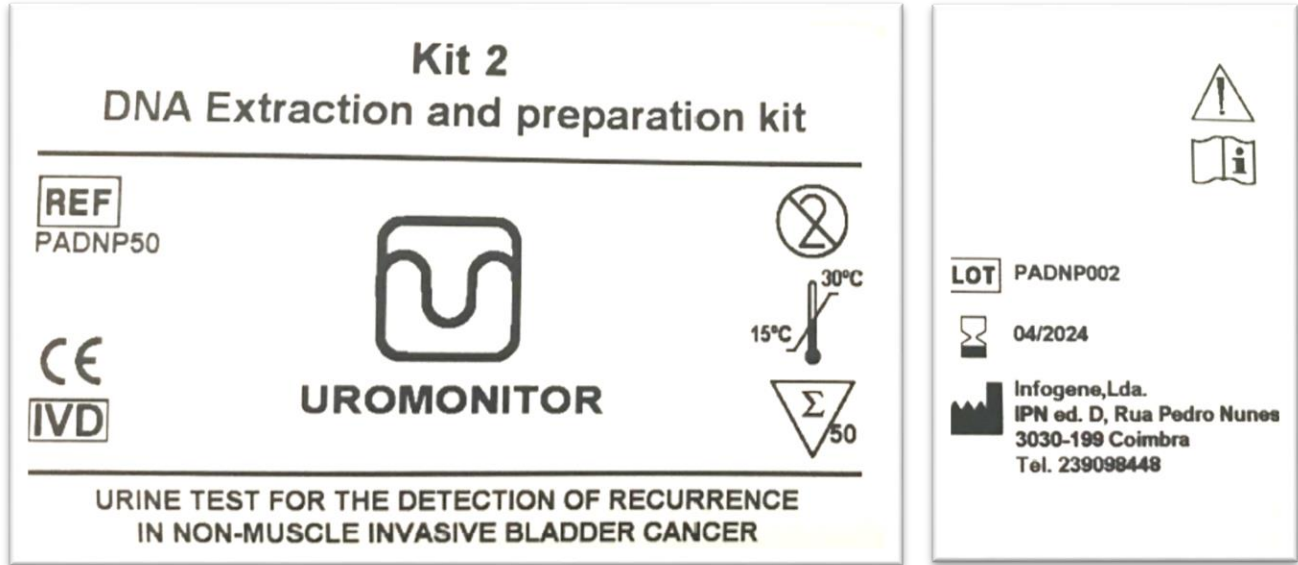
APROBADO POR A.N.M.A.T. CON PM-1252-221



MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA - M.N. 9483  
DT - TECNO LAB S.A.  
Director Técnico  
Firma y Sello



**KIT 2 – DNA EXTRACTION AND PREPARATION KIT** (Referencia: PADNP50)



**IMPORTADOR:** TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Argentina. Teléfono: 54-11- 4-555-0010.

**DIRECTOR TECNICO:** Bioq. Marisol Masino.

**ORIGEN DE ELABORACION:** Infogene. Lda (IPN Edificio D, Rua Pedro Nunes, 3030-199, Coimbra, Portugal)

Venta a Laboratorios de Análisis Clínicos – Uso Profesional Exclusivo

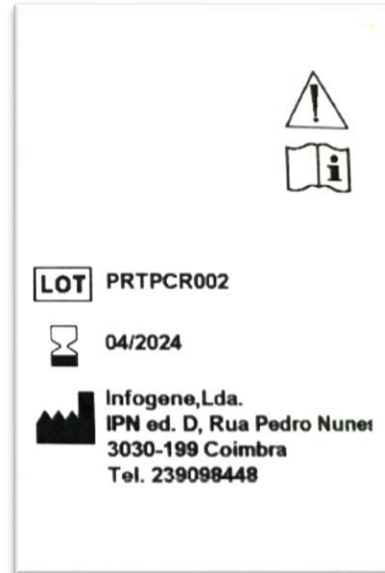
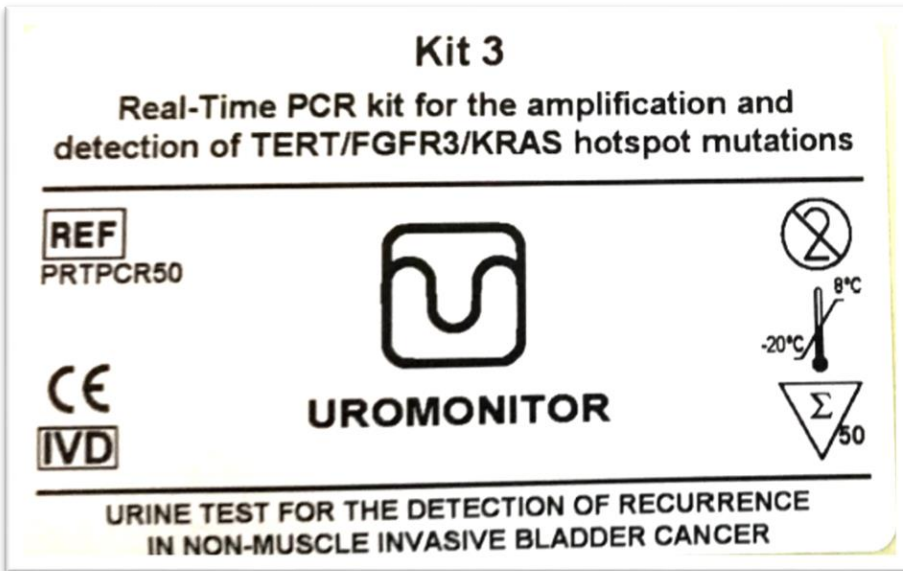
APROBADO POR A.N.M.A.T. CON PM-1252-221

MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico  
Firma y Sello



**KIT 3 – REAL-TIME PCR KIT FOR THE AMPLIFICATION AND DETECTION OF TERT/FGFR3/KRAS HOSPOT MUTATIONS** (Referencia: PRTPCR50)



**IMPORTADOR:** TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Argentina. Teléfono: 54-11- 4-555-0010.

**DIRECTOR TECNICO:** Bioq. Marisol Masino.

**ORIGEN DE ELABORACION:** Infogene. Lda (IPN Edificio D, Rua Pedro Nunes, 3030-199, Coimbra, Portugal)

Venta a Laboratorios de Análisis Clínicos – Uso Profesional Exclusivo

APROBADO POR A.N.M.A.T. CON PM-1252-221

MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

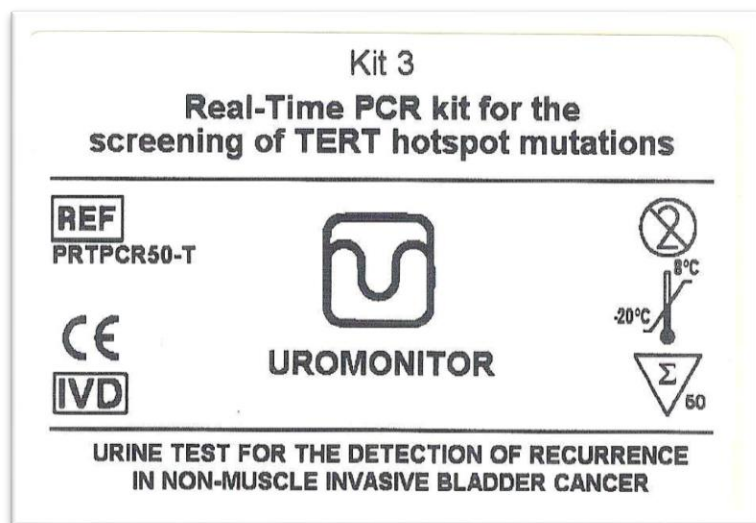
Director Técnico  
Firma y Sello



**Nota Aclaratoria 1** - el kit 3 a su vez está compuesto por 4 cajas separadas según se detalla:

1. **PRTPCR50-T** (PCR en Tiempo Real para el screening de mutaciones de puntos críticos en el gen **TERT**)
2. **PRTPCR50-F** (PCR en Tiempo Real para el screening de mutaciones de puntos críticos en el gen **FGFR3**)
3. **PRTPCR50-K** (PCR en Tiempo Real para el screening de mutaciones de puntos críticos en el gen **KRAS**)
4. **PRTPCR50-C (Controles de ADN Positivo y Negativo)** para usar con los ensayos de amplificación de TERT, FGFR3 y KRAS, y Proteinasa K para la extracción de ADN).




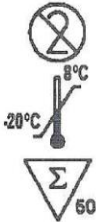
**PRTPCR50-T** (PCR en Tiempo Real para el screening de mutaciones de puntos críticos en el gen **TERT**)







  
**MARISOL MASINO**  
 BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.  
 Director Técnico  
 Firma y Sello



**PRTPCR50-F** (PCR en Tiempo Real para el screening de mutaciones de puntos críticos en el gen **FGFR3**)

Kit 3 <b>Real-Time PCR kit for the screening of FGFR3 hotspot mutations</b>		 
<b>REF</b> PRTPCR50-F  <b>CE</b> <b>IVD</b>	 <b>UROMONITOR</b>	 <b>LOT</b> P0002-F 04/2024 Infogene,Lda. IPN ed. D, Rua Pedro Nunes 3030-199 Coimbra Tel. 239098448
<b>URINE TEST FOR THE DETECTION OF RECURRENCE IN NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER</b>		

**PRTPCR50-K** (PCR en Tiempo Real para el screening de mutaciones de puntos críticos en el gen **KRAS**)

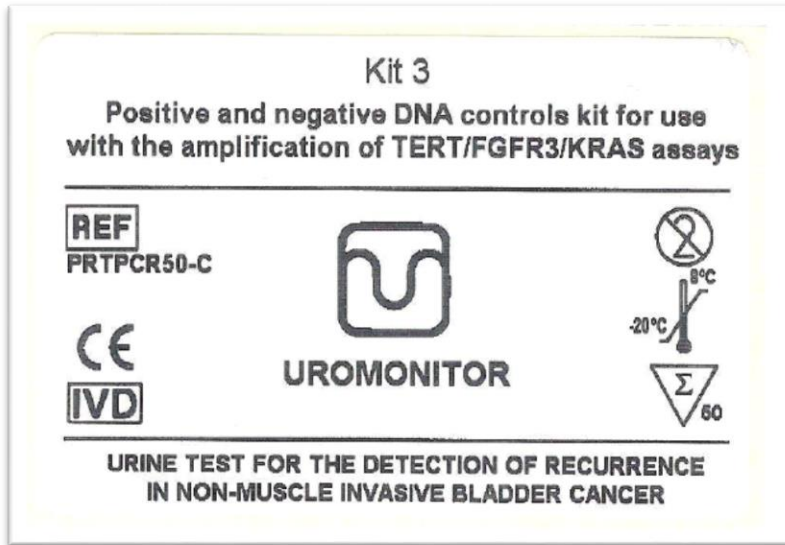
Kit 3 <b>Real-Time PCR kit for the screening of KRAS hotspot mutations</b>		 
<b>REF</b> PRTPCR50-K  <b>CE</b> <b>IVD</b>	 <b>UROMONITOR</b>	 <b>LOT</b> P0002-K 04/2024 Infogene,Lda. IPN ed. D, Rua Pedro Nunes 3030-199 Coimbra Tel. 239098448
<b>URINE TEST FOR THE DETECTION OF RECURRENCE IN NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER</b>		

MARISOL MASINO  
 BIOQUIMICA - M.N. 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico  
 Firma y Sello



**PRTPCR50-C (Controles de ADN Positivo y Negativo)** para usar con los ensayos de amplificación de TERT, FGFR3 y KRAS, y Proteinasa K para la extracción de ADN).



  
**MARISOL MASINO**  
BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico  
Firma y Sello

**PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS - UROMONITOR**

**KIT 1 – URINE FILTERING KIT** (Referencia: PUF50)

**Nota aclaratoria 2:** los componentes del kit 1 (manual de instrucciones, jeringa de 10 ml, filtro redondo, tapas para el filtro, bolsa hermética) no poseen rótulos primarios internos.

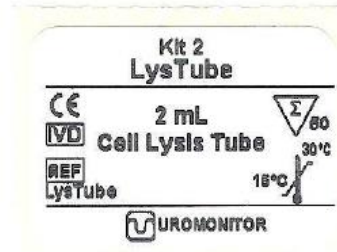
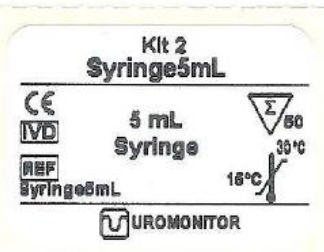
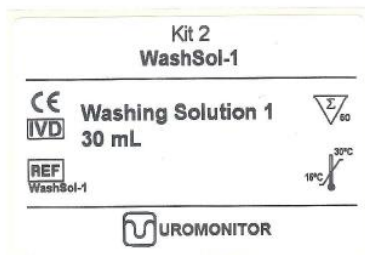
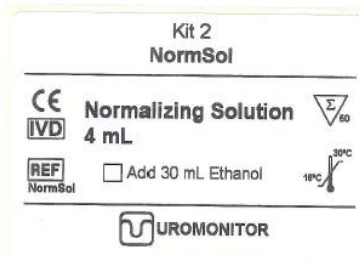
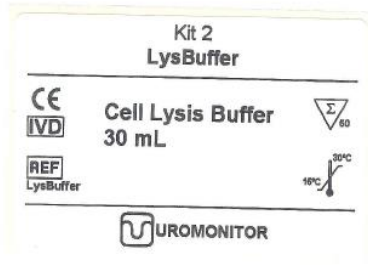


**Foto que muestra los componentes del kit 1**

  
**MARISOL MASINO**  
 BIOQUIMICA - M.N. 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.  
 Director Técnico  
 Firma y Sello



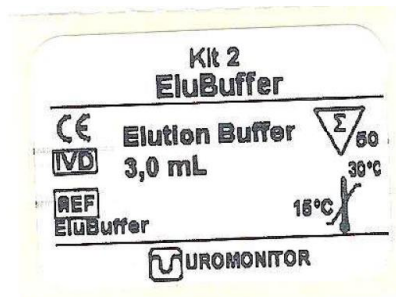
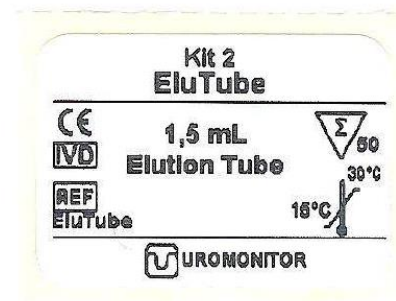
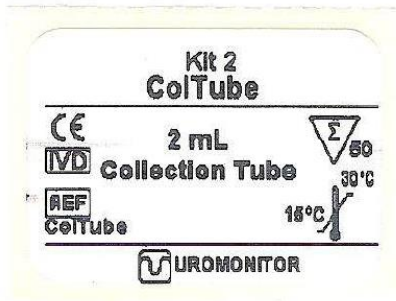
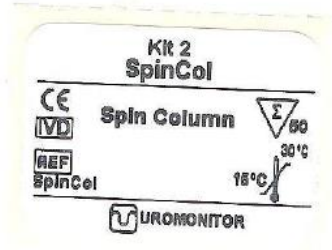
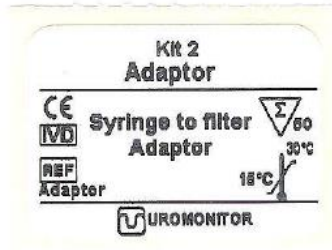
**KIT 2 – DNA EXTRACTION AND PREPARATION KIT** (Referencia: PADNP50)



MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA - M.N. 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico  
Firma y Sello





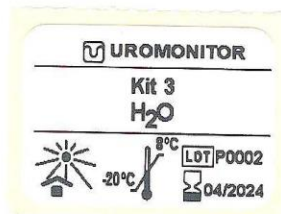
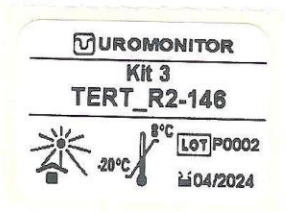
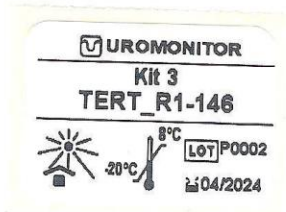
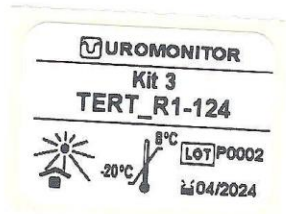
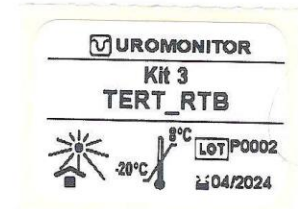
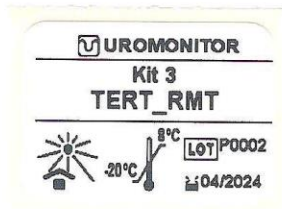
MARISOL MASINO  
 BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico  
 Firma y Sello



**KIT 3 – REAL-TIME PCR KIT FOR THE AMPLIFICATION AND DETECTION OF TERT/FGFR3/KRAS HOSPOT MUTATIONS** (Referencia: PRTPCR50)

PRTPCR50-T (Real-Time PCR kit for the screening of TERT hotspot mutations)

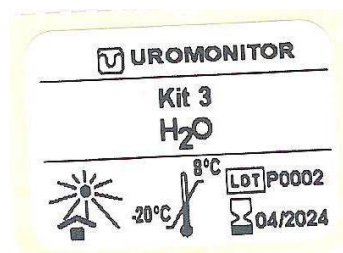
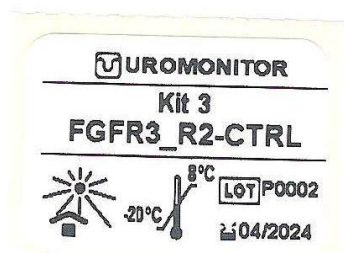
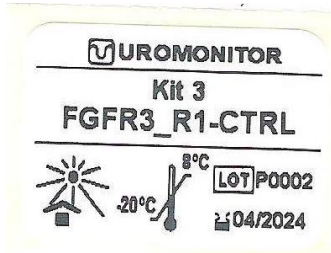
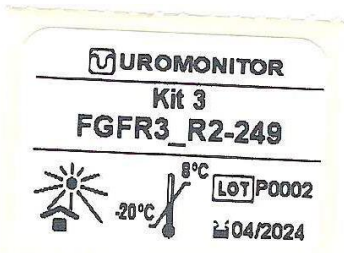
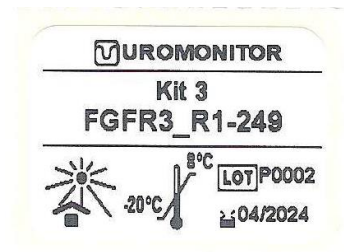
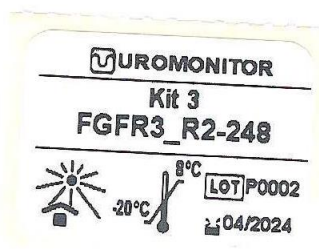
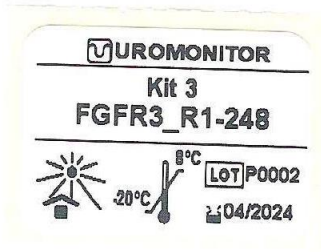
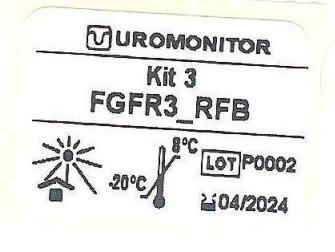
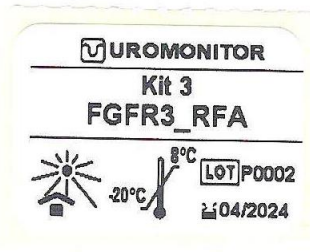


MARISOL MASINO  
 BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico  
 Firma y Sello



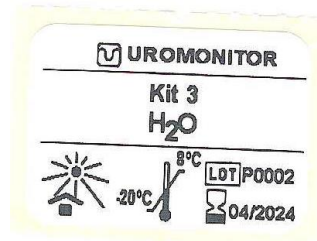
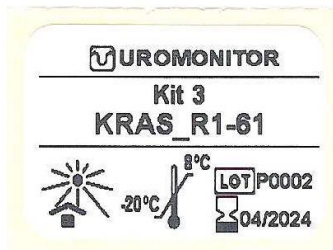
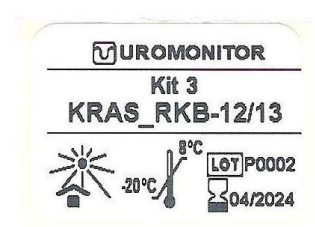
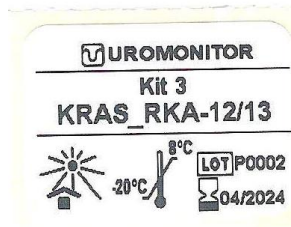
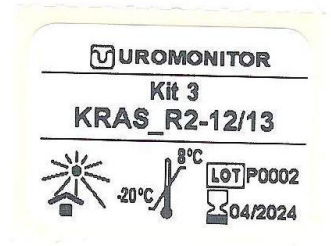
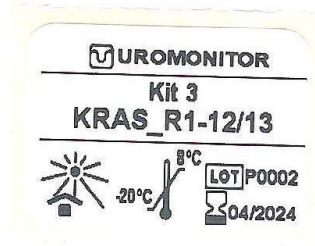
PRTPCR50-F (Real-Time PCR kit for the screening of FGFR3 hotspot mutations)



MARISOL MASINO  
 BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.  
 Director Técnico  
 Firma y Sello



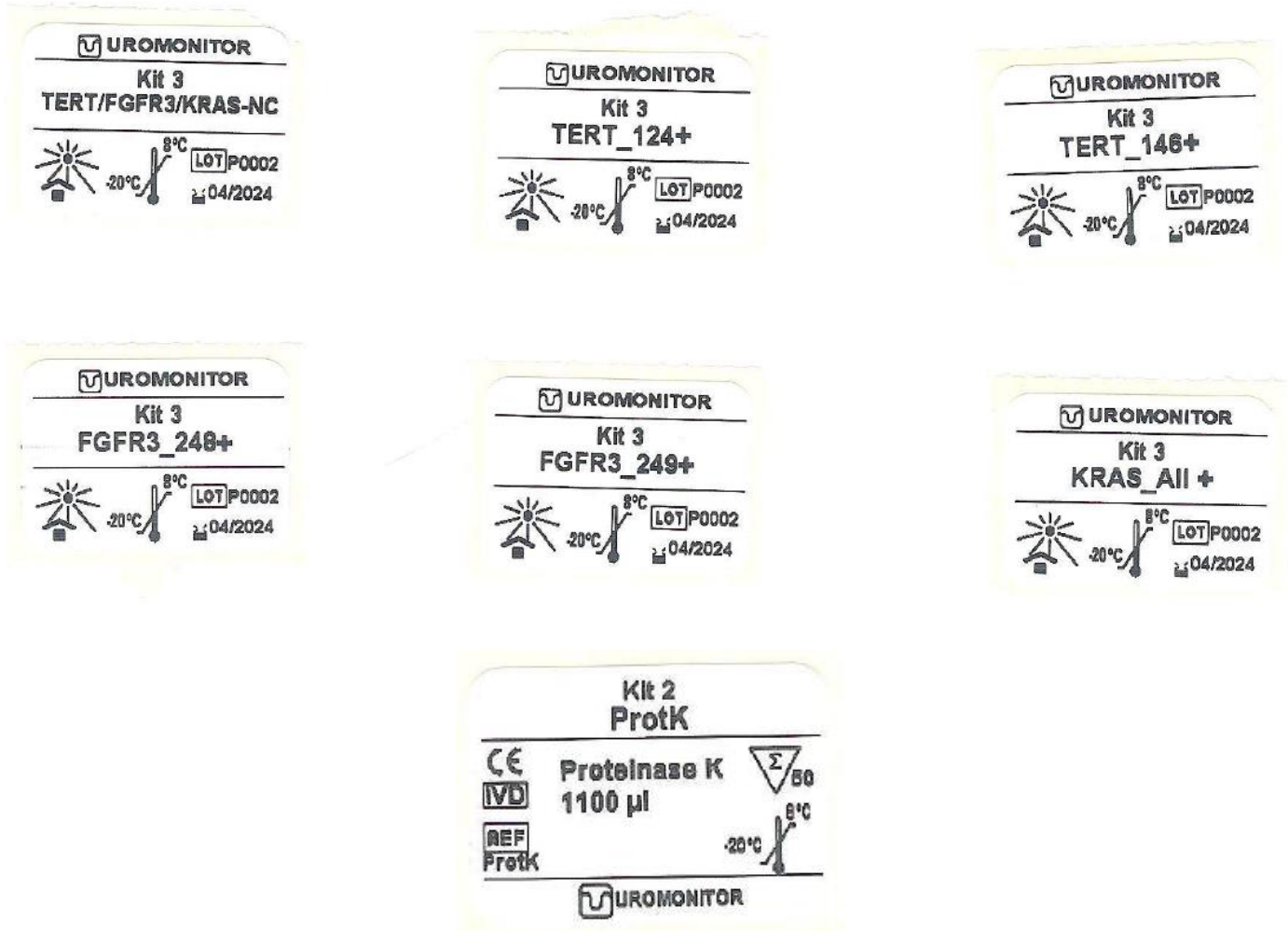
**PRTPCR50-K (Real-Time PCR kit for the screening of KRAS hotspot mutations)**



  
**MARISOL MASINO**  
 BIOQUÍMICA - M.N. 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.  
 Director Técnico  
 Firma y Sello



**PRTPCR50-C** (Positive and negative DNA controls to use with the amplification of TERT, FGFR3 and KRAS Assays, and Proteinase K for DNA extraction)



**Nota aclaratoria 3:** la Proteinasa K es un componente del kit 2, pero es suministrada dentro del kit 3 porque debe ser conservada en frío (de -20 °C a 8 °C).





República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

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

**Número:**

**Referencia:** TECNOLAB S.A. rótulos e instrucciones de uso

---

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 49 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE  
Date: 2023.12.11 10:43:41 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL  
ELECTRONICA - GDE  
Date: 2023.12.11 10:43:43 -03:00



**República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional**  
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

**Certificado - Redacción libre**

**Número:**

**Referencia:** 1-0047-3110-001385-23-7

---

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN  
PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Expediente N° 1-0047-3110-001385-23-7

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

**DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS**

Nombre Descriptivo: Uromonitor® es un sistema diseñado para detectar y controlar el carcinoma de vejiga músculo no invasivo mediante la detección de mutaciones de puntos críticos en los genes TERT, FGFR3 y KRAS por PCR en Tiempo Real desde el ADN extraído de células exfoliadas presentes en la orina humana.

Marca comercial: Uromonitor®

Modelos:

Uromonitor® integra un flujo de trabajo conformado por los siguientes kits que deben ser utilizados en su conjunto como un sistema:

1) UroKit 1 - Urine filtering kit (Referencia: PUF50).

2) UroKit 2 - DNA extraction and preparation kit (Referencia: PADNP50).

3) Urokit 3 - Real-Time PCR kit for the amplification and detection of TERT, FGFR3 and KRAS hotspot mutations (Referencia: PRTPCR50). A su vez este kit está compuesto por 4 kits: 3a) PRTPCR50-T (para mutaciones TERT), 3b) PRTPCR50-F (para mutaciones FGFR3), 3c) PRTPCR50-K (para mutaciones KRAS) y 3d) PRTPCR50-C (controles).

Indicación/es de uso:

1) kit de filtrado de orina para concentrar las células exfoliadas que se encuentran en dicha muestra. El Urokit 1 se presenta como parte del flujo de trabajo de la prueba Uromonitor® y debe ser usado como un sistema junto al Urokit 2 y 3.

2) Kit para la preparación y extracción de ADN desde las células filtradas con el Urokit 1. Este kit provee un método rápido y eficiente para la purificación de ADN celular de alta calidad desde las células exfoliadas presentes en la orina. El eluido de ADN purificado es adecuado para usarse con el procedimiento de PCR en tiempo real de la prueba Uromonitor (Urokit 3). El Urokit 2 se presenta como parte del flujo de trabajo de la prueba Uromonitor® y debe ser usado como un sistema junto al Urokit 1 y 3.

3) kit de PCR en Tiempo Real para amplificación y la detección de mutaciones en el promotor del gen TERT, en los codones 248 y 249 del gen FGFR3, y en los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS. El Urokit 3 se presenta como una parte del flujo de trabajo de la prueba Uromonitor® y debe ser usado como un sistema junto al Urokit 2 y 3.

Forma de presentación: 1) Kit para 50 muestras. Compuesto por: 50 x bolsas de plástico con cierre hermético con etiqueta para identificación de muestra, 50 x Jeringas de 10 mL, 50 x filtros redondos y 100 x tapas de filtro.

2) Kit para 50 muestras. Compuesto por: 50 x jeringas de 5 mL, 50 x tubos de 2 mL para la lisis celular, 50 x adaptadores del filtro de jeringa, 1 x Buffer de Lisis Celular por 30 ml, 1 x Proteinasa K (provisto en el urokit 3) de 1100 µL, 1 x Solución Normalizadora de 4 ml, 1 x Solución de Lavado de 30 mL, 1 x Solución de Lavado 2 de 12.5 mL, 50 x columnas de centrifugación, 100 x tubos de recolección de 2 mL, 50 x tubos de elución 1.5 mL y 1 x Buffer de Elución de 3 mL.

3) El Urokit 3 se compone por las siguientes 4 cajas:

3a) kit para 50 muestras. Referencia: PRTPCR50-T. Kit de PCR a Tiempo Real para el screening de mutaciones de punto caliente del gen TERT. Compuesto por los siguientes viales: 1 x TERT\_RMT por 1300 µL, 1 x TERT\_RTA por 116 µL, 1 x TERT\_RTB por 116 µL, 1 x TERT\_R1-124 por 26 µL, 1 x TERT\_R2-124 por 26 µL, 1 x TERT\_R1-146 por 26 µL, 1 x TERT\_R2-146 por 26 µL y 1 x H2O por 1000 µL.

3b) kit para 50 muestras. Referencia: PRTPCR50-F. Kit de PCR a Tiempo Real para el screening de mutaciones de punto caliente del gen FGFR3. Compuesto por los siguientes viales: 1 x FGFR3\_RMF de 1960 µL, 1 x FGFR3\_RFA de 260 µL, 1 x FGFR3\_RFB de 78 µL, 1 x FGFR3\_R1-248 de 34 µL, 1 x FGFR3\_R2-248 de 34 µL, 1 x FGFR3\_R1-249 de 34 µL, 1 x FGFR3\_R2-249 de 34 µL, 1 x FGFR3\_R1-CTRL de 34 µL, 1 x FGFR3\_R2-CTRL de 34 µL y 1 x H2O por 1000 µL.

3c) kit para 50 muestras. Referencia: PRTPCR50-K. Kit de PCR a Tiempo Real para el screening de mutaciones de punto caliente del gen KRAS). Compuesto por los siguientes viales: 1 x KRAS\_RMK por 1300 µL, 1 x KRAS\_RKA-12/13 por 58 µL, 1 x KRAS\_RKB-12/13 por 58 µL, 1 x KRAS\_R1-12/13 por 34 µL, 1 x KRAS\_R2-



12/13 por 26 µL, 1 x KRAS\_RKA-61 por 58 µL, 1 x KRAS\_RKB-61 por 58 µL, 1 x KRAS\_R1-61 por 34 µL, 1 x KRAS\_R2-61 x 26 µL y 1 x H2O por 1000 µL

3d) Kit para 50 muestras. Referencia: PRTPCR50-C. Kit con controles positivos y negativos de ADN para usar con la amplificación de los ensayos TERT, FGFR3 y KRAS, y Proteinasa K para la extracción de DNA. Compuesto por los siguientes viales: 1 x TERT/FGFR3/KRAS-NC por 20 µL, 1 x TERT\_124+ por 20 µL, 1 x TERT\_146+ por 20 µL, 1 x FGFR3\_248+ por 20 µL, 1 x FGFR3\_249+ por 20 µL, 1 x KRAS\_All+ por 20 µL y 1 x Proteinasa K (componente del UROKIT2) por 1100 µL.

Período de vida útil:

1) 24 meses desde la fecha de elaboración cuando es conservado a temperatura ambiente (15°C a 30 °C).

2) 12 meses desde la fecha de elaboración cuando es conservado a temperatura ambiente (15°C a 30 °C).

3a) 3b) 3c) y 3d) 12 meses desde la fecha de elaboración cuando es conservado de 2°C a 8 °C

Nombre del fabricante: Infogene LDA

Lugar de elaboración: IPN Edificio D, Rua Pedro Nunes, 3030-199,Coimbra,Portugal

Grupo de Riesgo: Grupo C

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 1252-221 , con una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la Disposición autorizante.

Expediente N° 1-0047-3110-001385-23-7

N° Identificadorio Trámite: 46540

am