



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N°

1312

BUENOS AIRES, 04 FEB 2015

VISTO el expediente N° 1-47-7885/13-0 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma BIOSYSTEMS S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in vitro" denominado EGFR Mutation Analysis Kit (EGFR-RT52) / detección de mutaciones somáticas en el exón 18, 19, 20, 21 de EGFR .


Que a fojas 226 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establecen que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

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

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

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y 1886/14.

 Por ello;



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

**DISPOSICIÓN N° 1312**

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

**DISPONE:**

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos del producto de diagnóstico para uso in Vitro denominado EGFR Mutation Analysis Kit (EGFR-RT52) / detección de mutaciones somáticas en el exón 18, 19, 20, 21 de EGFR, el que será elaborado por EntroGen Inc., 18750 Oxnard St. Suite 409, Tarzana, CA 91356 (U.S.A.) en envases conteniendo: EGFR Reaction Master Mix (2X) (5 x 1350 µl), EGFR Primer/Probe Mix (A: EGFR T790M, B: EGFR Exon 19 Deletions, C: EGFR L858R, D: EGFR L861Q, E: EGFR S768I, F: EGFR G719X, G: EGFR Exon20 Ins GCT/CAC y H: EGFR Exon 20 Ins9, cada uno conteniendo 380 µl) y EGFR Positive Control Mix (120µl), para 52 determinaciones, con una vida útil de DOCE (12) MESES desde la fecha de elaboración, conservado a -20°C e importado terminado por la firma BIOSYSTEMS S.A. y que la composición se detalla a fojas 147.

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 123 a 128 y 186 a 221 (Desglosándose fjs. 123, 124, y 186 a 197) debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTÍCULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MEDICA se reserva el derecho de reexaminar los



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

# DISPOSICIÓN N° 1312

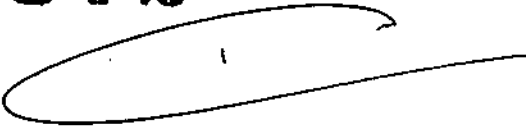
métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese, gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por Mesa de Entradas de la Dirección Nacional de Productos Médicos notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el certificado correspondiente. Cumplido, Archívese.-

EXPEDIENTE N° 1-47-7885/13-0

DISPOSICIÓN N°: **1312**

Fd



Ing ROGELIO LOPEZ  
Administrador Nacional  
A.N.M.A.T.



Av. Dorrego 673  
 1414 - Buenos Aires  
 Tel.: 54-11-4854-7775  
 Fax: 54-11-4857-0884  
 e-mail: info@biosystems.com.ar

**1312**



123

**ROTULOS**

**Rótulos Internos**

Tubo No.	Descripción del Contenido	Rótulo
A	EGFR T790M Mutation Detection Mix - 1 tubo por kit	EGFR T790M Detection Primer Mix Vol. 380   EGFR-RT52 Exp. Lot
B	EGFR Exon 19 Deletions Mutation Detection Mix - 1 tubo por kit	EGFR Exon 19 Deletion Detection Primer Mix Vol. 380   EGFR-RT52 Exp. Lot
C	EGFR L858R Mutation Detection Mix - 1 tubo por kit	EGFR L858R Detection Primer Mix Vol. 380   EGFR-RT52 Exp. Lot
D	EGFR L861Q Mutation Detection Mix - 1 tubo por kit	EGFR L861Q Detection Primer Mix Vol. 380   EGFR-RT52 Exp. Lot
E	EGFR S768I Mutation Detection Mix - 1 tubo por kit	EGFR S768I Detection Primer Mix Vol. 380   EGFR-RT52 Exp. Lot
F	EGFR G719X Mutation Detection Mix - 1 tubo por kit	EGFR G719X Detection Primer Mix Vol. 380   EGFR-RT52 Exp. Lot
G	EGFR InsGGT/CAC Mutation Detection Mix - tubo por per kit	EGFR Exon 20 InsGGT/CAC Detection Primer Mix Vol. 380   EGFR-RT52 Exp. Lot
H	EGFR Ins9 Mutation Detection Mix - 1 tubo por kit	EGFR Exon 20 Ins9 Detection Primer Mix Vol. 380   EGFR-RT52 Exp. Lot

Descripción del contenido	Rótulo
Reaction Master Mix, 2X concentration - 5 tubos por kit	EGFR Mutation Detection Reaction Master Mix (2X) Vol. 1350   EGFR-RT52 Exp. Lot
Positive Control Standard - 1 tubo por kit	EGFR Mutant Positive Control Mix for EGFR-RT52 Vol. 120   10 ng/l Lot.:

Lic. Alejandro Díez  
 Apoderado  
 BioSystems S.A.

Dra. Silvia Zamela  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 MN 14742  
 BIOSYSTEMS S.A.

1312

124

ROTULO EXTERNO



## EGFR Mutation Analysis Kit

For Real-Time PCR

Cat. No. EGFR-RT52

For detection of exons 18, 19, 20 and 21 somatic mutations

Primers • Probes • Reaction Mix • Control Standards

Store @ -20°C

Reaction Mix Lot No.: 12345678

Primer Mix Lot No.: 12345678

Exp. Date: 09/2011

EntroGen, Inc.  
18750 Osgood St, Ste 409  
Tarzana, CA 91356, USA  
T. +1 818 342 2770 F. +1 818 342 3801  
<http://www.entrogen.com>



FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Importado por:

**BioSystems S.A**

Av. Dorrego 673 (C1414CKB)

TEL:(54-11)4854-7775

Directora Técnica: Silvina Zanela MN 14421

Producto para diagnóstico de uso In Vitro

Uso Profesional Exclusivo

Autorizado por ANMAT Certificado N°:

Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.

**EntroGen**  
Predictive • Preventive • Personalized

1312



Almacenar a -20°C

**CE IVD**

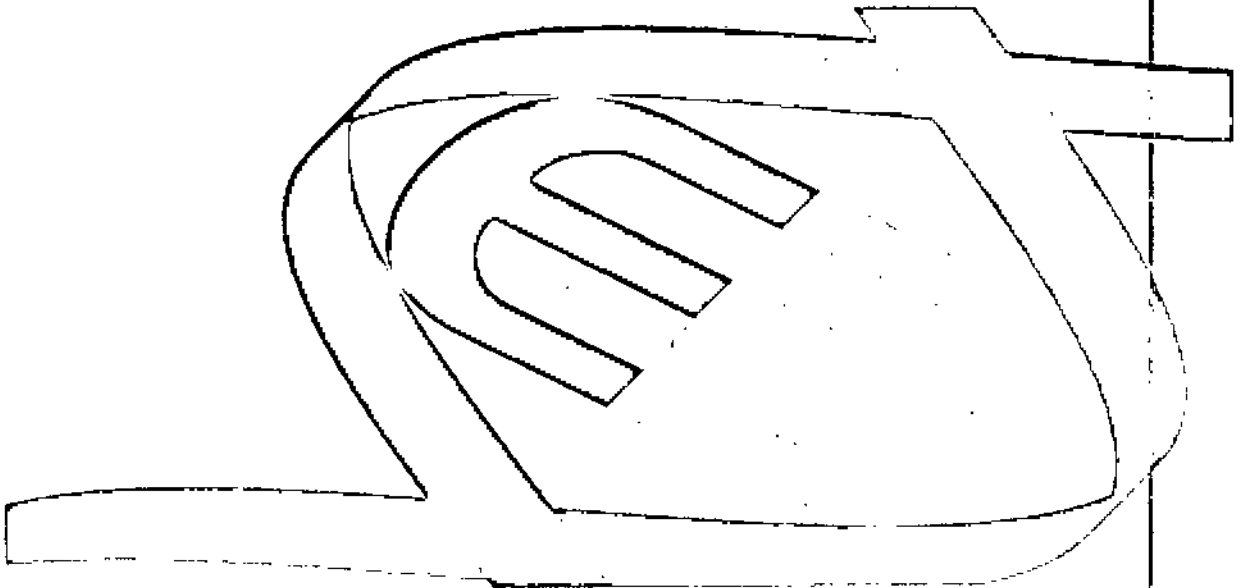
Para uso en Diagnostico In Vitro

## EGFR Mutation Analysis Kit

Para PCR en tiempo real

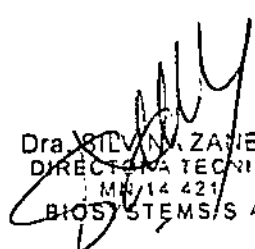
Kit para la detección de mutaciones somáticas en el exón 18, 19, 20, 21 de EGFR.  
Catálogos No: EGFR-RT52

Válido en:  
ABI Prism® (7000, 7300, 7500, 7700 & 7900HT)



Instrucciones de Uso. Versión 1.6

  
**EntroGen**  
Predictive • Preventive • Personalized  
  
Lic. Alejandro Niez  
Aprobado  
BioSystems S.A.

  
Dra. SILVANA ZAVIELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MÉDICA 421  
BIOSYSTEMS S.A.

# EGFR Mutation Analysis Kit

For Real Time PCR

Kit para la detección de mutaciones somáticas en el exón 18, 19, 20, 21 de EGFR.

## 1. Uso previsto:

El kit para el análisis de mutaciones del gen EGFR está diseñado para la detección de mutaciones somáticas en los exones 18, 19 20 y 21 en ADN genómico purificado a partir de tejidos humanos.

**Advertencia:** Este kit se validó en los Instrumentos que figuran en la primera página de este manual. El comprador de este equipo debe seguir las instrucciones de este manual a través de instrumentos y reactivos validados. Cualquier uso fuera de las indicaciones de este kit y / o modificación de los componentes anulará la responsabilidad de EntroGen.

Listado de las mutaciones en EGFR detectadas:

Exon 18	Exon 19	Exon 20	Exon 21
G719A - 2156G>C	2235-2249 del 15	2239-2247 del 9	L858R - 2573T>G
G719S - 2155G>A	2235-2252>AAT del 18	2239-2253 del 15	L861Q - 2582T>A
G719C - 2155G>T	2236-2253 del 18	2239-2256 del 18	
	2237-2251 del 15	2239-2248>C del 10	
	2237-2254 del 18	2239-2258>CA del 20	
<b>Exon 20</b>	2237-2255>T del 19	2240-2251 del 12	
T790M - 2369C>T	2236-2250 del 15	2240-2257 del 18	
S768I - 2303G>T	2238-2255 del 18	2240-2254 del 15	
2307-2308 ins	2238-2248>GC del 11	2239-2251>C del 13	
GCCAGCGTG	2238-2252>GCA del 15		
2319-2320 ins CAC			
2310-2311 ins GGT			

## 2. Reactivos e instrumentos:

### 2.1 Contenido del envase

Kit EGFR-RT52

Nombre	No. de Pruebas	No. de tubos	Vol. Por Tubo (µl)
EGFR Reaction Master Mix (2X)	52	5	1350
EGFR Primer/Probe Mix	52	87	380
EGFR Positive Control Mix	52	1	120

El control positivo contiene una mezcla de secuencias de ADN sintético que corresponde a cada mutación detectada por este kit en un background de ADN genómico de tipo salvaje (wild-type). La relación mutante de tipo salvaje es aproximadamente 1:01.

¶ Cada tubo contiene una mezcla cebador / sonda distinta para detectar la mutación EGFR designada. El contenido de estos tubos no debe ser mezclado.

### 2.2 Manipulación y Almacenamiento

Este producto se suministra con bolsas de hielo congeladas. Deben conservarse a -20°C en freezer no frost inmediatamente luego de recibido.

La **master mix** (mezcla maestra) se puede conservar entre 4°C a 8°C si se va a usar dentro de las 3 semanas, sino conservar a -20°C. Conservar todos los otros reactivos a -20°C.

Evitar repetir ciclos de congelamiento y descongelamiento ya que reducirá la eficiencia de la enzima.

- Guardar todos los componentes en el envase original sin abrir.
- La mezcla cebador/sonda debe ser protegida de la luz en todo momento para evitar la fotodecoloración
- Centrifugar los tubos antes de ser abiertos

Lidia Alejandra Diez  
Abogada  
BioSystems S.A.

Dra. SILVIA ZANELLA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 421  
BIOSYSTEMS S.A.



- La fecha de caducidad de cada componente está impreso en la etiqueta de cada tubo. Este producto mantendrá su rendimiento hasta esta fecha. Su funcionamiento no está garantizado después de esta fecha de caducidad.

La conservación y manejo de los componentes de este producto bajo otras condiciones que no sean las descriptas pueden afectar la performance del ensayo y afectar negativamente los resultados.

### 2.3 Estabilidad del producto

Este producto y sus componentes deberán mantener la performance (rendimiento) hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta de cada tubo, siempre que las condiciones de almacenamiento y manipulación descriptas anteriormente se cumplan correctamente.

### 2.4 Control de Calidad

Los componentes de este producto están fabricados bajo estándares cGMP (Buenas Prácticas de Manufactura). Las cGMP requieren una amplia validación y documentación de los procedimientos de fabricación para garantizar la más alta calidad de la producción.

Los ensayos fueron validados en el ABI Prism 7500®. El Certificado de análisis de cada lote está disponible en caso de ser requeridos.

### 2.5 Advertencias y Precauciones:

La reacción de amplificación por PCR es extremadamente sensible a la contaminación cruzada. Es importante llevar a cabo los pasos de pre-amplificación (Purificación del ADN y preparación de la reacción de PCR) en áreas separadas, preferentemente con sistemas de ventilación de aire puro. Es especialmente importante que la preparación de la reacción de PCR se lleve a cabo en una habitación con presión de aire positiva (ó cabina de flujo laminar)

Otras precauciones adicionales son necesarias para evitar la contaminación entre muestras / reactivos:

- Limpiar el área de trabajo con etanol 70%
- Limpiar las pipetas y el equipo con etanol al 70%
- Abrir cuidadosamente cada tubo de microcentrifuga luego de vortexear y mezclar, evitando tocar el interior de la tapa ya que puede haber gotas de líquido dentro de la tapa.
- Usar tips con filtro para todos los pasos de pipeteo para evitar contaminación cruzada.
- Cambiar los tips de las pipetas al realizar cada transferencia de líquidos.
- Siempre usar guantes cuando se manejan los reactivos/ADN y cambiarlos entre los pasos de pre-amplificación y post-amplificación.
- El flujo de los tubos, pipetas, racks y otros equipos utilizados deberán ser de pre-amplificación a post-amplificación, y nunca al revés.

## 3. Equipos y materiales requeridos:

### 3.1 Reactivos

El kit no contiene los reactivos para la extracción del ADN genómico de muestras tumorales.

El ADN genómico a partir de tejidos congelados o fijado con formalina embebido en parafina (FFPE) puede ser extraído por medio de reactivos comunes de laboratorio (por ejemplo, QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen).

Este ensayo requiere el uso de agua calidad molecular libre de nucleasa.

### 3.2 Equipos

El equipamiento requerido para el ensayo es:

- Equipo de PCR en Tiempo Real
- Guantes libre de talco
- Pipetas
- Tips estériles
- Vórtex
- Centrifuga de mesa
- Placa de 96 pocillos (consulte el manual del equipo de PCR para placas compatibles)
- Film de sellado óptico para placas PCR
- Tubos de microcentrifuga de 2,0 ml y 0,2 ml (opcional)

Dr. Alejandro Díez  
Apoderado  
Biosystems S.A.

Dr. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.N.M. 4 421  
BIOSYSTEMS S A



#### 4. Descripción del Producto:

##### 4.1 Introducción

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una proteína de membrana que juega un rol central en la transmisión de señales que promueven el crecimiento y la proliferación celular. Su dominio tirosina quinasa (TK) activa efectores que permiten la activación de la vía Ras-Raf-MAPK.

La sobreexpresión y las mutaciones oncogénicas que activan constitutivamente el dominio tirosin quinasa del EGFR fueron halladas en varios tumores sólidos.

Además, una excesiva activación del EGFR ha sido asociada a estadios avanzados del cáncer, y a un mal pronóstico.

##### 4.2 Acerca del Ensayo

El kit EGFR es un ensayo ultrasensible que permite detectar las mutaciones somáticas en los exones 18,19,20 y 21 del EGFR. El ensayo trabaja por amplificación de las secuencias mutadas específicas en muestras que contienen una mezcla de ADN mutado y ADN tipo salvaje y utiliza sondas fluorescentes para la detección. Las mutaciones detectadas por este kit son las siguientes:

- T790M
- Delecciones del Exón 19: detecta 19 delecciones pero no las distingue entre ellas.
- L858R
- L861Q
- S768I
- G719X: Detecta G719A, G719S y G719C pero no las distingue entre ellas.
- Inserciones del Exón 20: detecta 2319-2320 insCAC y 2310-2311 insGGT, pero no las distingue entre ellas.
- Inserción Exón 20: detecta 2307-2308 insGCCAGCGTG (ins9)

Cada reacción contiene un juego de cebadores y sondas para la detección de las mutaciones de EGFR y un control endógeno.

Los cebadores del control endógeno amplifican un gen no relacionado que es usado para determinar las condiciones de los reactivos y también para chequear que la reacción contiene suficiente cantidad de ADN para amplificar.

#### 5. Instrucciones de Uso:

##### 5.1 Aislamiento de DNA:

Existen varios métodos para la purificación del ADN. Siga el procedimiento de aislamiento de acuerdo a lo sugerido por el protocolo del fabricante.

Cantidad suficiente de ADN puede ser purificado a partir de secciones de tejido fresco o fijado en taco de parafina (aproximadamente 2-10 µg). Este ensayo requiere aproximadamente 80 ng de ADN por cada muestra por corrida (10 ng/reacción).

Luego de la purificación del ADN, medir la concentración mediante análisis espectrofotométrico y ajustar a 10 ng/µl. Si la concentración está por debajo de 10 ng/µl, ajustar el volumen de agua durante la configuración (seteo) de la reacción.

##### 5.2 Preparación de los reactivos (para todos los equipos):

- Descongelar la mezcla cebador/sonda, la mezcla control positivo y la mezcla maestra 2X.
- Centrifugar los tubos durante 10 segundos a 10,000 rpm a temperatura ambiente.

Las reacciones de PCR están configuradas (seteadas) en un volumen total de 30µl/muestra. Las mezclas de reacción para muestras múltiples (como también para la muestra del control positivo) deberían ser pre-mezcladas como una mezcla maestra con un exceso de volumen de 5-10% para compensar las pérdidas debidas al pipeteo de las muestras. Los siguientes reactivos van (se utilizan) en cada 30 µl de reacción:

Componentes	Volumen
Mezcla de Reacción 2X	15 µl
Mezcla de cebadores	7 µl
Muestra ADN (10 ng/ul)	1 µl
Agua grado molecular	7 µl

Nota: mayor volumen de muestra de ADN puede ser necesario si la concentración es inferior a 10 ng /µl. En tales casos, el volumen de agua debe ser ajustada para explicar el aumento de volumen de agua.

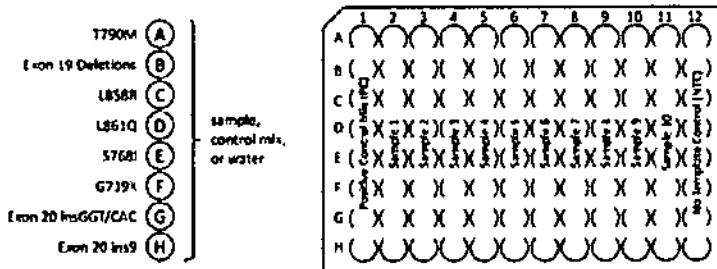
Dr. Alejandro Díez  
Apocero  
BioSystems S.A.

Dra. SILVIA  
DIRECTORA TECNICA  
MN 14 221  
BIO

1. Preparar la mezcla de reacción principal para cada muestra como está indicado:

Reactivo	Concentración Final	Volumen por muestra
Mezcla maestra de reacción 2X	1X	126 µl
Mezcla de Control Positivo de ADN, Agua, o ADN de la muestra en 10 ng/µl	10 ng	8.4 µl
Agua libre de nucleasa		58.8µl

- Mezclar vortexeando y centrifugar durante 10 segundos a 8500 rpm a temperatura ambiente
- Agregar 23 µl de la Master Mix por cada pocillo en la columna (A-H).
- Agregar 7 µl de cada mix de primer/sonda en su pocillo correspondiente como se indica debajo.



Nota: Ocho reacciones son configuradas para cada muestra

- Mezclar con la pipeta varias veces.
- Sellar la placa con un papel film óptico
- Centrifugar brevemente la placa para reducir las gotitas de las paredes laterales. (Opcional para placa solida)

5.3 Configuración (Seteo) del equipo

Instrumento ABI Prism ® 7500 (SDS Software versión 2.0 o superior)  
 Crear un nuevo experimento: Archivo> Nuevo Experimento> Configuración avanzada.  
 En Propiedades del experimento:

- Escriba un nombre para el experimento y seleccionar el instrumento (7500 o 7500 Fast).
- Seleccione Cuantificación - Ct Comparativa (ΔΔCt) para el tipo de experimento.
- Seleccione Reactivos TaqMan ® y estándar para el tipo de reactivos y la velocidad de rampa, respectivamente.
- Haga clic en Configuración de placa en el menú de navegación de la izquierda.

En Definir objetivos y Muestras

- Haga clic en Añadir nuevo objetivo y establecer lo siguiente, como se muestra en la siguiente tabla:

*Dr. Alejandro Díaz*  
 Apodensado  
 BioSystems S.A.

*Dr. Silvia WZANELA*  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 MA 14.421  
 BIOSYSTEMS S.A.

Nombre	Fluoróforo	Inhibidor
IC	VIC	None Fluorescent (NFQ)
EGFR	FAM	None Fluorescent (NFQ)

1. Añadir PC para la mezcla de control positivo, NTC control Negativo (agua), y los nombres / números de la muestra desconocida.
2. Añadir las muestras y los detectores a la placa como se muestra en la página anterior.
3. Ajuste el colorante de referencia pasiva (sólo en algunos instrumentos) a " NINGUNO ".
4. Crear un nuevo método de corrida con los siguientes parámetros y controle el experimento.

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Recopilación de Datos
95°C	10 min	1	
95°C	15 seg	40	
58°C	30 seg		FAM, VIC

**Rotor-Gene Q, la versión de software 1.7 y superiores y Rotor-Gene 3000 Software versión 6.1.93**

1. Seleccione Archivo> Nuevo, haga clic en la ficha Opciones avanzadas del cuadro de diálogo, seleccione DOS PASOS y haga clic en Nuevo.
2. Seleccione Rotor 72-Bueno, marque la casilla anexa al anillo de seguridad, haga clic en Siguiente y, a continuación Saltar Asistente.
3. Vaya a Ver> Configuración Ejecutar, escriba 30 µl de volumen de reacción y haga clic en Aceptar.
4. Vaya a Ver> Editor de perfiles. Debería haber dos ciclos catalogados; Asimiento y Ciclismo.
5. Introduzca los siguientes parámetros haciendo clic en cada paso en el panel de la derecha:

Mantener	95°C	10 minutos	No Adquirir
Paso temporizado	95°C	15 segundos	No Adquirir
Paso temporizado 40 ciclos	58°C	30 segundos	Adquisición de ciclo A en verde, amarillo

6. Haga clic en Aceptar. También puede guardar este perfil para su uso futuro con el botón Guardar como en la parte superior del cuadro de diálogo.
7. Ir a Ver> Obtener Optimización, seleccionar Todos los Canales de la configuración de Canal menú desplegable, y seleccione la casilla junto a realizar la Optimización Antes Primera Adquisición. Nota: Este paso sólo es necesario para llevar a cabo una vez para cada nuevo lote de reactivos. Una vez determinados los valores de ajuste, utilice los mismos ajustes para corridas futuras con reactivos con el mismo número de lote
8. Cargue las tiras de tubos en el rotor.
9. Ir a Ejecutar> Inicio Ejecutar, a continuación, haga clic en el botón Inicio para comenzar la corrida.

Nota: El cuadro de diálogo Editar Muestras se abre una vez que comience la corrida. La información de la muestra puede introducirse mientras el Instrumento corre o después de que la corrida se ha completado.

**Roche LightCycler® 480 (versión de software 1.5 o superior)**

1. En el Navegador, haga clic en Nuevo para iniciar un nuevo Experimento LightCycler® 480.
2. Seleccione la Sonda de Hidrólisis Dual En color / Sonda UPL para el Formato de Detección.
3. Haga clic en Personalizar para asegurarse que FAM (460-510) y VIC/HEX/555 (533-580) amarillo se seleccionan.
4. Cambiar el volumen de reacción a 30 µl.
5. Agregue el siguiente programa y los objetivos de temperatura:

Nombre del Programa	Ciclo	Modo de análisis
Desnaturalizar	1	Ninguno
Ciclo	40	Cuantificación

Lic. Alejandro Díaz Apud  
Biosystems S.A.

Dra. SILVIA ZAÑELA  
DIRECTORA TECNICA  
MAY 14 42'  
BIOSYSTEMS S A

1312



Para el paso Desnaturalizar:

Objetivo (°C)	Modo de adquisición	Mantener (hh:mm:ss)
95	Ninguno	00:10:00

Para el paso del Ciclo:

Objetivo (°C)	Modo de adquisición	Mantener (hh:mm:ss)	Velocidad de rampa (°C/s)
95	Ninguno	00:00:05	4.4
58	Solo	00:00:30	2.2

6. Ir a Editor de Muestras y seleccione Rel Quant como Flujo de Trabajo, a continuación, asignar muestras a la placa.
7. Seleccione el botón Experimento y haga clic en Inicio Ejecutar para guardar el archivo y comenzar la corrida

**Bio-Rad CFX96 (versión del software 1.4 y superiores)**

1. En el Asistente de inicio, seleccione Crear nuevo experimento y asegúrese de seleccionar CFX96 en la lista desplegable. Haga clic en Aceptar.
2. En la ficha Protocolo de la ventana Configuración Experimento seleccione Crear Nuevo e Introduzca los siguientes parámetros de los ciclos.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	95°C	10 min
2	95°C	15 sec
3	58°C	30 sec
+ Leer Placa		
4	GOTO 2 39 veces mas	
	FIN	

3. Cambiar el volumen de muestra a 30 µl.
4. Cuando haya terminado, haga clic en Aceptar para guardar el modelo de protocolo. Tenga en cuenta la ubicación del modelo de protocolo guardado para utilizarlo para las siguientes ejecuciones. Haga clic en Siguiete para ir a la ventana de configuración de la Placa.
5. En la pestaña de la Placa, haga clic en Crear nuevo para crear un diseño de la placa.
6. Haga clic en el botón Seleccionar fluoróforos y seleccione las casillas FAM y CIV. Todo lo demás debe estar sin marcar. Haga clic en Aceptar.
7. Seleccione la primera fila (A1- H1) en el diseño de la placa y cambie el tipo de muestra a control positivo.
8. Seleccione la segunda fila (A2 -H2) en el diseño de la placa y cambie el tipo de muestra a NTC Control Negativo.
9. Seleccione el resto de los pocillos (A3 - H12) en el diseño de la placa y cambie el tipo de muestra a Desconocido.
10. Seleccione cada fila Individual (a partir de A3- H3) y escriba el nombre de la muestra en el campo Nombre de la muestra. Cuando haya terminado, pulse Introducir en el teclado para grabar el nombre de la muestra. Realice este paso para cada muestra.
11. Haga clic en Configuración y seleccione el tipo de placa utilizado (por ejemplo, BR blanco o BR transparente).
12. Cuando haya terminado, haga clic en Aceptar para guardar el diseño de la placa.
13. Haga clic en Siguiete, haga clic en Inicio y luego en Ejecutar para iniciar la corrida.

Uc. Apoderado  
Apoderado  
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA FANEL  
DIRECTORA TECNICA  
MIGUEL  
BIOSYSTEMS S.A.

## 6. Análisis de Datos

### 6.1 Interpretación de Resultados

*Applied Biosystems 7500, SDS versión 2.0 y superiores.*

Analizar los datos en el software del equipo de PCR en tiempo real utilizando los siguientes criterios:

- Umbral Manual (véase la tabla siguiente para los valores de umbral)
- Inicio automático

Instrumento	Umbral FAM	Umbral VIC
StepOne/StepOne Plus	10,000	1,000
7500/7500 Fast	50,000	50,000
7900HT	3.0	1.0

*Rotor-Gene Q, versión de software 1.7 y superiores y Rotor-Gene 3000 Software versión 6.1.93.*

Analizar los datos en el software del equipo de PCR en tiempo real utilizando los siguientes criterios:

- Tubo Dinámico: On
- Pendiente correcta: On
- Umbral Canal Verde: 0.06
- Umbral Canal Amarillo: 0.04

*LightCycler® 480, versión de software 1.5 o superior.*

Analizar los datos en el software del equipo de PCR en tiempo real utilizando los siguientes criterios:

- Abs Quant/2nd Max Derivado de todas las muestras

*Bio-Rad CFX96, versión de software 1.4 o superior.*

Analizar los datos en el software del equipo de PCR en tiempo real utilizando los siguientes criterios:

- Ct Modo Determinación: Umbral simple
- Modo de análisis: Baseline Subtracted Curve Fit
- Línea de base y Umbral: Automático

Las instrucciones siguientes son para todos los instrumentos

1. Compruebe el control endógeno (IC / Amarillo / VIC) de cada muestra mediante la selección de los 8 pocillos. El CT debe ser similar en las 8 reacciones dentro de cada muestra, sin embargo este valor depende en gran medida de la cantidad de ADN amplificable presente en la reacción y puede diferir entre las muestras FFPE individuales debido a la fragmentación del ADN. El rango normal de IC CT es 22-32 para muestras FFPE.
  - a. Si todos los pocillos tienen una señal de IC, continuar con el análisis.
  - b. Si todos los pocillos en una muestra dada no tienen una señal de IC, la reacción falló y no hay necesidad de continuar con el análisis de esa muestra.
  - c. Es posible que un solo pocillo en una muestra dada puede no tener una señal de IC. Esto ocurre de vez en cuando en las muestras con altas cantidades de variante mutante y es debido a la competencia por los reactivos de amplificación. Continuar con el análisis, ya que es normal.

Estos pasos se resumen en la siguiente tabla.

Si VIC®/ Ct Amarillo is:	Descripción de Análisis	Acción
Entre 22y 32	Rango ideal CT	Continúe con el paso 4
Debajo de 22	Reacción sobrecargada	Diluir el ADN y repetir la prueba.
Por encima de 32	ADN insuficiente (la muestra puede contener altas cantidades de ARN), fragmentación, o presencia de inhibidores de la PCR en el ADN.  El ensayo puede trabajar solamente para las muestras que contienen alta cantidad de la variante mutante.	Si el ADN es insuficiente y/o está fragmentado, aumentar la entrada de ADN por reacción y repetir la prueba.  Si la muestra contiene inhibidores PCR, disminuir la cantidad de entrada de ADN por reacción y repetir la prueba.
Ausente	Uno de los componentes de reacción o el ADN no fue añadido correctamente.	La prueba para esa muestra particular ha fallado. No continúe con el análisis.

Lic. Alejandro Diez  
Apoyado  
Biosystems S.A.

Dra. SILVANA CANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIOSYSTEMS S.A.

2. Seleccione los pocillos de control positivos y compruebe cada detector FAM para una señal.
  3. Seleccione los 8 pocillos de reacción de cada muestra desconocida y compruebe los detectores FAM para la señal. Si no hay señal presente, la muestra no contiene la mutación que se corresponde con el detector seleccionado. Dado que las muestras FFPE pueden contener diferentes cantidades de células tumorales, los valores de CT para las reacciones mutantes pueden variar en gran medida. Muestras de mutantes con mayor contenido de ADN del tumor tendrán valores de CT más pequeñas, mientras que las muestras mutantes con menor contenido de ADN del tumor tendrán valores más altos CT.
- Los valores de CT positivos normales pueden oscilar entre 20 a 38. Si una muestra tiene un valor CT de menos de 20, diluir la muestra y repetir la reacción. Si el valor es superior a CT 38.01, repetir la reacción con más ADN.

La siguiente tabla resume los pasos de análisis para el canal FAM<sup>®</sup> / verde.

Si CT FAM <sup>®</sup> / verde es	Estado de la mutación
38 o menos	Positiva
Por encima de 38,01 o ausente	Negativo

## 7. Validación del funcionamiento

### 7.1 Precisión

Tres sets de muestras independientes (total de 24 muestras) preparados por EntroGen fueron analizados tres veces utilizando 2 lotes diferentes de reactivos. Los juegos de la muestra contuvieron materiales de referencia de FFPE (Horizon Discovery) para T790M, Delecciones del exón 19, L858R, L861Q, y las mutaciones G719A. En los casos en que el material de referencia de FFPE no se encontraba disponible, se utilizó ADN sintético diluido en ADN genómico de tipo salvaje aislado a partir de tejido pulmonar normal para evaluar la reproducibilidad del ensayo.

Mutación	5% Carga	StDev	1% Carga	StDev	0.5% Carga	StDev
T790M	32.51	0.13	33.71	0.41	34.64	1.04
Ex19 Del	33.34	0.25	35.74	0.68	37.12	.71
L858R	30.70	0.08	33.34	0.33	34.26	0.64
L861Q	27.33	0.14	30.55	0.45	32.27	0.66
S768I	31.71	0.31	34.26	0.52	35.12	0.87
G719X	29.81	0.20	32.18	0.25	33.45	0.48
INS GGT/CA C	30.15	0.09	32.78	0.37	34.10	0.66
INS9	29.44	0.14	32.57	0.33	35.72	0.40

### 7.2 Límite de Detección

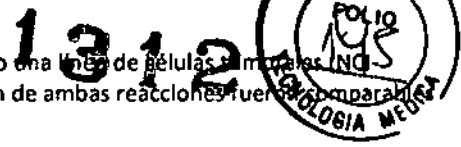
Controles mutantes sintéticos se generaron y se diluyeron en el ADN genómico de tipo salvaje a diversas concentraciones (calculado por el número de copias). Tres lotes de reactivos independientes se utilizaron en este análisis.

Mutación	Límite de Detección
T790M	0.1%
Exon 19 Deletions	0.5%
L858R	0.1%
L861Q	0.5%
S768I	0.1%
G719X	0.5%
Exon 20 Insertions	1.0%

Lic. Alejandro Díaz  
Arce  
BioSystems S.A.

Dra. STEVINA ZAMORA  
DIRECTORA TECNICA  
MN 14421  
BIOSYSTEMS S.A.

Además fue llevado a cabo el análisis adicional del límite de detección usando una línea de células tumorales (H1975) que contiene las mutaciones T790M y L858R. Los límites de detección de ambas reacciones fueron comparados con aquellos reportados en la tabla superior.



### 7.3 Exactitud

La exactitud del ensayo fue establecida probando 250 muestras de ADN purificado a partir de muestras de adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas fijados en tacos de parafina, que previamente fueron chequeadas para las deleciones del exón 19 y la mutación L858R por un método publicado de PCR-RFLP.

Las muestras con resultados discrepantes fueron analizadas luego mediante secuencia de terminación marcada bidireccional usando un secuenciador ABI 3730.

Estos resultados están resumidos en la siguiente tabla.

Mutación	Detectado por PCR en tiempo real (n=250)	Detectado por PCR-RFLP (n=250)	Detectado por secuenciación de terminación de colorante (n=11)
Wild-Type	190	201	0
T790M	3	0*	3
Exon 19 Del	19	18	1
L858R	32	31	1
L861Q	0	0*	0
S768I	1	0*	1
G719X	3	0*	3
INS GGT/CAC	0	0*	0
INS9	2	0*	2

\*Ninguna detección para la mutación correspondiente

### 7.4 Reactividad cruzada

El ADN genómico tipo salvaje y el correspondiente a la mutación fueron insertados en un plásmido con una carga de 5 %, 1 %, y 0.5 % y analizados por triplicado utilizando dos lotes de kits diferentes. Los valores de CT de cada mutación fueron promediados entre las diferentes corridas y presentados en la tabla debajo. El nivel de reactividad cruzada entre las ocho reacciones es mínimo.

Mutante	Señal T790M	Señal DEL	Señal L858R	Señal L861Q	Señal S768I	Señal G719X	Señal INS	Señal INS9
T790M	33.62	---	---	---	---	---	38.74	---
DEL	---	35.40	---	---	---	---	---	---
L858R	39.80	---	32.77	---	---	---	---	---
L861Q	---	---	---	30.05	---	---	39.69	---
S768I	39.43	---	---	---	33.70	---	---	39.72
G719X	---	---	---	---	---	31.81	---	---
INS GGT/CAC	---	---	---	---	---	---	32.34	---
INS9	---	---	---	---	---	---	---	32.58

Nota: El patrón de reactividad cruzada puede ser ligeramente diferente cuando se usa ADN purificado a partir de muestras tumorales fijadas en FFPE.

### 7.5 Tolerancia a los ciclos de temperatura

La amplificación por PCR puede ser afectada en gran medida por los cambios en las temperaturas de calentamiento y temperatura de extensión. Si bien los instrumentos de PCR deben ser calibrados periódicamente conforme a los procedimientos recomendados por el fabricante, pueden existir leves diferencias de temperatura entre los distintos equipos.



Lic. Alejandro Diez  
 Apodado  
 BioSystems S.A.

Dra. SILVIA  
 DIRECTORA  
 MEX 16 421  
 BIOSYSTEMS S.A.

Para determinar la tolerancia de temperaturas del ensayo, cada reacción fue realizada usando los extractos de los cánceres colorectales plásmido diluido al 50 % a distintas temperaturas de calentamiento (56°C, 58°C, 60°C) en un ABI Prism® 7700. Los resultados de las diferencias de rango de los valores de Ct para cada reacción son descriptos en la tabla siguiente.

Temperatura de calentamiento			
Mutante	56°C	58°C	60°C
T790M	24.81	25.21	25.74
Exon 19 Del	25.33	26.14	25.19
L858R	24.17	24.93	26.01
L861Q	24.40	24.91	25.15
S768I	24.28	25.06	25.99
G719X	25.06	26.49	25.58
INS GGT/CAC	26.10	27.32	27.39
INS9	26.71	26.97	26.40

Los valores de CT se encuentran dentro de un rango aceptable para todas las reacciones a las distintas temperaturas de calentamiento, indicando la robustez del ensayo.

## 8. Referencias

1. Benvenuti S. y col., La activación oncogénica de la vía de señalización RAS / RAF afecta la respuesta de los cánceres colorectales metastásicos a terapias de anticuerpos del receptor de factor de crecimiento anti-epidérmicos. Cancer Res. 2007 15 de marzo; 67 (6) :2643-8.
2. Salomon DS. et al., epidérmicas péptidos relacionados con el factor de crecimiento y sus receptores en tumores malignos humanos. Critical Reviews in Oncología / Hematología 1995; 19:183-232.

## 9. Historial de Revisión

Fecha de la Última edición: octubre 2013 Versión 1.6  
Resumen de los cambios: los valores de umbral a la Sección de análisis de datos. Actualización tabla de precisión en el apartado 7.1.

Fecha de la Última edición: abril 2013 Versión 1.5  
Resumen de cambios: Actualización uso previsto y de descripción de producto.

Fecha de la Última Edición: Enero 2012 Version 1.4  
Resumen de cambios: instrucciones de Bio-Rad CFX96 Alta.

Fecha de la Última edición: octubre 2012 Versión 1.3  
Resumen de cambios: Se ha actualizado la configuración y las instrucciones de análisis. Tabla de análisis en el capítulo 6.

Fecha de la Última Edición: Abril 2012 Version 1.2  
Resumen de Cambios: Agregado EN980 símbolos armonizados. Añadido Qiagen Rotor-Gene®e® instrucciones de instalación y análisis de Roche LightCycler.

Fecha de la Última Edición: Septiembre 2011 Version 1.1  
Resumen de cambios: Se ha actualizado Uso previsto (Sección 1), Descripción del producto (Sección 4) y Referencias (Sección 8).

Fecha de la Última Edición: Junio 2011 Version 1.0  
Resumen de cambios: Documento creado.

Lic. Alejandra Díez  
Apoderado  
BioSystems S.A.

Dra. SILVIA ZANFI A  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN: 4421  
BIOSYSTEMS S.A.



## 10. Símbolos utilizados

REF

LOT



CE IVD

EC REP

## 11. Notificación al comprador

### 11.1 Condiciones de la garantía

EntroGen garantiza que, en el momento del envío, los productos están libres de defectos de materiales y fabricación y se ajustan a las especificaciones de EntroGen. Sujeto a verificación por EntroGen y previa notificación por escrito del cliente, si cualquier producto no se ajusta a las especificaciones, o cualquier defecto de material o fabricación aparece dentro de los 30 días a partir de la fecha de envío; EntroGen, a su sola discreción se compromete a reparar o sustituir los productos defectuosos.

### 11.2 Limitación de la garantía

Esta garantía no cubre los daños a los productos, debido al mal uso, selección del sitio inadecuado de funcionamiento por el Cliente o cualquier otra acción que sea contraria a las instrucciones recomendadas y a los parámetros de diseño de los productos.

Esta garantía no cubre daños o defectos ocasionados por reparaciones o traslado de los productos por cualquier persona que no sea representante de EntroGen. Además, este producto está diseñado para llevar a cabo las reacciones en la sensibilidad analítica especificada en función de que el ADN no está muy fragmentado y no contiene materiales que podrían inhibir la reacción de amplificación. Esta garantía no cubre los daños debidos a los accidentes, vandalismo, incendio, inundación, u otros factores ambientales o de cualquier otra índole de fuerza mayor. La garantía no incluye elementos suministrados por terceros, tales como computadoras y software relacionado. Si usted tiene preguntas acerca de la cobertura de garantía, por favor póngase en contacto con Servicio al Cliente de EntroGen.

## 12. Información de Contacto



EntroGen, Inc  
18750 Oxnard Street, Suite 409  
Tarzana, CA 91356, USA  
Tel: +1 818 342 2770  
Fax: +1 818 342 3801  
Email: [info@entrogen.com](mailto:info@entrogen.com); [support@entrogen.com](mailto:support@entrogen.com)  
Web: [www.entrogen.com](http://www.entrogen.com)

EC REP

Antisel SA  
116 Michalakopoulou Street  
115 27, Athens, Greece  
Tel: +30 210 779 5980  
Fax: +30 210 771 6932  
Email: [antisel@antisel.gr](mailto:antisel@antisel.gr)  
Web: [www.antisel.gr](http://www.antisel.gr)

Alejandro Diez  
Alejandro Diez  
BioSystems S.A.

Dr. Silvia Zúñiga  
DIRECTORA TÉCNICA  
M 14.42  
BIOSYSTEMS S.A.



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DE VENTA DE  
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-7885/13-0

Se autoriza a la firma BIOSYSTEMS S.A. a importar y comercializar el Producto para diagnóstico de uso in vitro denominado EGFR Mutation Analysis Kit (EGFR-RT52) / detección de mutaciones somáticas en el exón 18, 19, 20, 21 de EGFR. Envases conteniendo EGFR Reaction Master Mix (2X) (5 x 1350 µl), EGFR Primer/Probe Mix (A: EGFR T790M, B: EGFR Exon 19 Deletions, C: EGFR L858R, D: EGFR L861Q, E: EGFR S768I, F: EGFR G719X, G: EGFR Exon20 Ins GCT/CAC y H: EGFR Exon 20 Ins9, cada uno conteniendo 380µl) y EGFR Positive Control Mix (120µl), para 52 determinaciones. Vida útil: DOCE (12) MESES desde la fecha de elaboración, conservado a -20°C. Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley Nº 16.463 y Resolución Ministerial Nº 145/98. Lugar de elaboración: EntroGen Inc., 18750 Oxnard St. Suite 409, Tarzana, CA 91356 (U.S.A.). En las etiquetas de los envases, anuncios y prospectos deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. Certificado

nº **008142**

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA

Buenos Aires,

04 FEB 2015

Firma y sello

Ing ROGELIO LOPEZ  
Administrador Nacional  
A.N.M.A.T.