



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

DISPOSICIÓN N° 1355

BUENOS AIRES, 05 FEB 2015

VISTO el expediente N° 1-47-8719/14-6 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma TECNOLAB S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in vitro" denominado therascreen EGFR RGQ PCR / para la detección de 29 mutaciones somáticas en el gen EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el instrumento Rotor-Gene Q, a partir de muestras de ADN de tejido de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE) .

Que a fojas 225 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.

✍



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

DISPOSICIÓN N° 1355

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

Por ello;

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

D I S P O N E:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos del producto de diagnóstico para uso in Vitro denominado therascreen EGFR RGQ PCR / para la detección de 29 mutaciones somáticas en el gen EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el instrumento Rotor-Gene Q, a partir de muestras de ADN de tejido de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE), el que será elaborado por Qiagen Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street North Manchester, M15 6SH (REINO UNIDO) e importado terminado por la firma TECNOLAB S.A., en envases conteniendo: Control de Reacción (Ctrl.: 2 X 600µl), Mezcla de reacción para T790M (T790M: 600µl), Mezcla de reacción para deleciones (Del: 600µl), Mezcla de reacción para L858R (L858R: 600µl), Mezcla de reacción para L861Q (L861Q: 600µl), Mezcla de reacción para G719X (G719X: 600µl), Mezcla de reacción para S768I (S768I: 600µl), Mezcla de reacción para inserciones (Ins: 600µl), Control positivo de EGFR (PC: 300µl), Taq ADN polimerasa (Taq: 138µl), Agua exenta de nucleasas



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

DISPOSICIÓN N°
1355

(H₂O: 2 X 1,9ml), para 24 determinaciones, con una vida útil de SEIS (6) MESES desde la fecha de elaboración, conservado entre -15°C y -25°C y que la composición se detalla a fojas 41.

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 49 a.99. (Desglosándose fjs. 49 a 65) 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 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° 1-47-8719/14-6

DISPOSICIÓN N°:

1355

Fd


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

PROYECTO DE RÓTULO EXTERNO

0:5 FEB 2015 135



therascreen EGFR RGQ PCR

Detección de 29 mutaciones somáticas en el gen EGFR, mediante una PCR en el instrumento Rotor-Gene Q, utilizando muestras de ADN de tejido de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE).



Uso Diagnóstico "In Vitro"

Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR			(24)
N.º de referencia			870111
Número de reacciones			24
Rojo	Control Reaction Mix (Mezcla de reacción para control)	Ctrl	2 x 600 µl
Púrpura	T790M Reaction Mix (Mezcla de reacción para T790M)	T790M	600 µl
Naranja	Deletions Reaction Mix (Mezcla de reacción para deleciones)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (Mezcla de reacción para L858R)	L858R	600 µl
Verde	L861Q Reaction Mix (Mezcla de reacción para L861Q)	L861Q	600 µl
Amarillo	G719X Reaction Mix (Mezcla de reacción para G719X)	G719X	600 µl
Gris	S768I Reaction Mix (Mezcla de reacción para S768I)	S768I	600 µl
Azul	Insertions Reaction Mix (Mezcla de reacción para inserciones)	Ins	600 µl
Marrón	EGFR Positive Control (Control positivo de EGFR)	PC	300 µl
Turquesa	Taq DNA Polymerase (Taq ADN polimerasa)	Taq	138 µl
Blanco	Nuclease-Free Water (Agua exenta de nucleasas)	H ₂ O	2 x 1,9 ml
	Manual		1

Ver "Instrucciones de uso"

Lote:	Vencimiento:
Conservación: - 15 a - 25 °C	

ORIGEN DE ELABORACION: QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street North, Manchester, M15 6SH, Reino Unido.

IMPORTADOR: TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964, CABA, Argentina.

DIRECTOR TÉCNICO: Bioq. Marisol Masino.

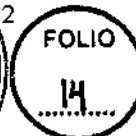
AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD - CERTIFICADO Nº

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

Bioq. Masino Marisol
D.T. - TecnoLab S.A.

PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS

1355



CTRL 600 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

S768I 600 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

T790M 600 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

Ins 600 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

Del 600 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

PC 300 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

L858R 600 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

Taq 138 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

L861Q 600 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

H₂O 1.9 ml
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

G719X 600 µl
2014-xx-xx Lote N°: T° conservación: - 15/ -25°C

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

Marzo de 2012

Manual del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

Versión 1

Σ 24

IVD

Para uso de diagnóstico *in vitro*

Para uso con el instrumento Rotor-Gene® Q 5plex HRM®

CE

REF 870111

HB 1063321ES

QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street
North, Manchester, M15 6SH, Reino Unido

R3 **MAT** 1063321ES



Sample & Assay Technologies

QIAGEN: tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito, desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN define los estándares en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación con microARN y ARNi
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para obtener más información, visite www.qiagen.com.



MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9486
DT - TECNOLAB S.A.



1355

Contenido	
Uso previsto	5
Resumen y explicación	5
Principio del procedimiento	6
Materiales suministrados	9
Contenido del kit	9
Materiales requeridos pero no suministrados	9
Advertencias y precauciones	11
Información de seguridad	11
Precauciones generales	11
Almacenamiento y manipulación de reactivos	12
Manipulación y almacenamiento de muestras	13
Procedimiento	13
Determinación del nivel de células tumorales requeridas para el análisis del gen EGFR	13
Aislamiento de ADN	14
Protocolos	
■ Valoración de las muestras	14
■ Detección de mutaciones de EGFR	17
■ Configuración del instrumento Rotor-Gene Q EGFR	20
Interpretación de los resultados	30
Análisis de los datos de valoración de las muestras	30
Análisis de los datos de mutación de EGFR	34
Guía de resolución de problemas	45
Control de calidad	46
Limitaciones	46
Características de rendimiento	47
Valores de corte	47
Límite de detección (LOD)	47
Precisión	48
Reproducibilidad	49
Efecto de la concentración de ADN introducido	49

Sustancias interferentes	50
Referencias	50
Símbolos	51
Información de contacto	51
Apéndice: detalles de mutación	52
Información para pedidos	54


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

Uso previsto

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR es una prueba de diagnóstico *in vitro* diseñada para la detección de las 29 mutaciones somáticas en el gen EGFR relacionado con el cáncer, con el fin de proporcionar una valoración cualitativa del estado de las mutaciones.

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR está concebido para el uso por parte de personal cualificado en entornos profesionales de laboratorio con muestras de ADN de tejido de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) fijado en formalina e incluido en parafina. Los resultados tienen como objetivo ayudar al personal médico a identificar pacientes con NSCLC que puedan beneficiarse de un tratamiento con inhibidores de la tirosinquinasa.

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR está diseñado para el uso de diagnóstico *in vitro*.

Resumen y explicación

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR es un equipo listo para utilizar que se ha diseñado para la detección de las 29 mutaciones somáticas en el gen EGFR relacionado con el cáncer, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el instrumento Rotor-Gene Q.

Con ayuda de las tecnologías Scorpions® y ARMS®, el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR permite detectar las siguientes mutaciones en un fondo de ADN genómico normal.

- 19 deleciones del exón 19 (detecta la presencia de cualquiera de las 19 deleciones, pero no distingue entre ellas)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (detecta la presencia de G719S, G719A o G719C, pero no distingue entre ellas)
- S768I
- 3 inserciones en el exón 20 (detecta la presencia de cualquiera de las 3 inserciones, pero no distingue ellas)

Los métodos que se utilizan en este kit son altamente selectivos y, en función del volumen total de ADN presente, permiten detectar un bajo porcentaje de mutaciones en ADN genómico normal. Los límites de selectividad y detección son superiores a los de otras tecnologías como la de secuenciación mediante terminadores fluorescentes.

Principio del procedimiento

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR combina las tecnologías ARMS y Scorpions para detectar mutaciones de PCR en tiempo real.

ARMS

La tecnología ARMS permite llevar a cabo una amplificación específica de los alelos o las mutaciones (amplificación refractaria de sistemas de mutaciones). La enzima Taq ADN polimerasa (Taq) resulta eficaz para diferenciar entre una coincidencia y un error de coincidencia en el extremo 3' de un primer o cebador de PCR. Algunas secuencias mutadas se amplifican de forma selectiva, incluso en muestras cuya mayoría de secuencias no presentan la mutación, por ejemplo: cuando la coincidencia con el cebador es completa, la amplificación se produce con total eficacia. Cuando no hay coincidencia con la base 3', únicamente tiene lugar una amplificación de fondo de bajo nivel.

Scorpions

La detección de la amplificación se realiza mediante la tecnología Scorpions. Scorpions es una técnica de moléculas bifuncionales que contienen un cebador de PCR unido covalentemente a una sonda. El fluoróforo de esta sonda interactúa con un quencher o silenciador, también incorporado en la sonda, lo que reduce la fluorescencia. Durante la reacción de la PCR, cuando la sonda se une al amplicón, se separan el fluoróforo y el silenciador. El resultado es un aumento de la fluorescencia en el tubo de reacción.

Formato del kit

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se suministra con ocho ensayos:

- Un ensayo de control (Ctrl)
- Siete ensayos de mutación

Todas las mezclas de reacción contienen reactivos para la detección de objetivos marcados con FAM™ y un control interno marcado con HEX™. El ensayo de control interno permite detectar la existencia de inhibidores que puedan conducir a resultados de falsos negativos. La amplificación de FAM puede dejar fuera de competencia a la amplificación del control interno y el propósito del control interno es simplemente mostrar que, si no hay amplificación de FAM, el resultado es un negativo auténtico y no una detección de PCR errónea.

Procedimiento

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR incluye un procedimiento de dos pasos. En el primer paso, el ensayo de control se realiza para evaluar el ADN total de una

1355

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

FOLIO 19

muestra. En el segundo paso, tanto la mutación como los ensayos de control se realizan para determinar la presencia o ausencia de ADN mutado.

Ensayos:

Ensayo de control

El ensayo de control, marcado con FAM, sirve para valorar el ADN total de la muestra. Este ensayo amplifica una región del exón 2 del gen EGFR. Los cebadores y la sonda están diseñados para evitar cualquier polimorfismo conocido del gen EGFR.

Se recomienda usar la mezcla de reacción para control (Ctrl) suministrada con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR a fin de valorar el ADN total de una muestra. El ensayo de control amplifica una región del exón 2 del gen EGFR. Se recomienda preparar las muestras únicamente con el ensayo de control usando el control positivo (PC) de EGFR como el control positivo y agua exenta de nucleasas (H₂O) como el control sin molde.

Nota: la valoración del ADN debería basarse en la PCR y puede diferir de la cuantificación basada en las lecturas de absorbancia. Se suministra mezcla de reacción para control (Ctrl) adicional para valorar la calidad y la cantidad de las muestras de ADN antes del análisis con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Ensayos de mutación

Cada ensayo de mutación contiene una sonda Scorpions marcada con FAM y un cebador ARMS para discriminar entre el ADN normal y el ADN mutante específico.

Controles

Nota: todas las series experimentales deben utilizar los controles que se indican a continuación.

Control positivo

Cada serie debe contener un control positivo en los tubos del 1 al 8. El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR contiene control positivo (PC) de EGFR para utilizarlo como molde en la reacción de control positivo. Se evaluarán los resultados de control positivo para garantizar que el kit funciona según los criterios de aceptación indicados.

Control negativo

Cada serie debe contener un control negativo ("control sin molde" o NTC) en los tubos del 9 al 16. El NTC está compuesto de agua exenta de nucleasas (H₂O) y se utiliza como "molde" en el control sin molde. El control sin molde se utiliza para evaluar las posibles contaminaciones durante la configuración de la serie y para evaluar el rendimiento de la reacción de control interna.

Evaluación de la reacción de control interna


Cada mezcla de reacción contiene un control interno, además de la reacción objetivo. Un error indica que pueden existir inhibidores que podrían derivar en resultados de falsos negativos o bien que se ha producido un error de configuración del usuario para ese tubo.

Si el error del control interno se debe a una inhibición de PCR, diluir la muestra podría reducir el efecto de los inhibidores, pero debe tenerse en cuenta que esto también diluiría el ADN objetivo. La amplificación de FAM puede dejar fuera de competencia a la amplificación del control interno, por lo que el valor de C_T (HEX) de IC generado podría estar fuera del rango especificado. Los resultados de FAM siguen siendo válidos para estas muestras.


MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - N.º 9483
DT - TECNO LAB S.A.

Materiales suministrados

Contenido del kit

Kit thetascreen EGFR RGQ PCR			(24)
N.º de referencia			870111
Número de reacciones			24
Rojo	Control Reaction Mix (Mezcla de reacción para control)	Ctrl	2 x 600 µl
Púrpura	T790M Reaction Mix (Mezcla de reacción para T790M)	T790M	600 µl
Naranja	Deletions Reaction Mix (Mezcla de reacción para deleciones)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (Mezcla de reacción para L858R)	L858R	600 µl
Verde	L861Q Reaction Mix (Mezcla de reacción para L861Q)	L861Q	600 µl
Amarillo	G719X Reaction Mix (Mezcla de reacción para G719X)	G719X	600 µl
Gris	S768I Reaction Mix (Mezcla de reacción para S768I)	S768I	600 µl
Azul	Insertions Reaction Mix (Mezcla de reacción para inserciones)	Ins	600 µl
Marrón	EGFR Positive Control (Control positivo de EGFR)	PC	300 µl
Turquesa	Taq DNA Polymerase (Taq ADN polimerasa)	Taq	138 µl
Blanco	Nuclease-Free Water (Agua exenta de nucleasas)	H ₂ O	2 x 1,9 ml
	Manual		1

Materiales requeridos pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más

información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre la seguridad de los materiales (MSDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

- Kit para el aislamiento de ADN (consulte el apartado "Aislamiento de ADN", en la página 14)
- Xileno
- Etanol (96-100%)*
- Tubos de microcentrifuga de 1,5 ml o 2 ml (para los pasos de lisis)
- Tubos de microcentrifuga de 1,5 ml (para los pasos de elución) (suministrados por Brinkmann [Safe-Lock, n.º de referencia 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, n.º de referencia 0030 120.086] o Sarstedt [Safety Cap, n.º de referencia 72.690])†
- Pipetas exclusivas‡ (ajustables) para la preparación de muestras
- Pipetas exclusivas‡ (ajustables) para la preparación de la mezcla maestra para PCR
- Pipetas exclusivas‡ (ajustables) para la dispensación de ADN molde*
- Puntas de pipeta exentas de DNAsa, RNAsa y ADN con filtros (para evitar la contaminación cruzada, recomendamos puntas de pipeta con barreras para aerosoles)
- Agitador calentador, incubador orbital térmico, bloque térmico o baño de agua que permita la incubación a 90 °C†
- Centrifugo de mesa‡ con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Vórtex
- Instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM‡ con canales de fluorescencia para Cycling Green y Cycling Yellow (detección de FAM y HEX, respectivamente)
- Software Rotor-Gene Q, versión 2.0.2 o superior
- Tiras de tubos y tapones, de 0,1 ml, para uso con un rotor de 72 pocillos (n.º de referencia 981103 ó 981106)
- Tubos de microcentrifuga exentos de DNAsa, RNAsa y ADN para la preparación de las mezclas maestras
- Tubos de 72 x 0,1 ml de bloque de carga, bloque de aluminio para la configuración de reacción manual con pipeta de un solo canal (QIAGEN, n.º de referencia 9018901)

* No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metilcelcetona.

† Esta no es una lista de proveedores completa.

‡ Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

Advertencias y precauciones

Para uso de diagnóstico *in vitro*

Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos correspondientes sobre la seguridad de los materiales (MSDS). Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/support/MSDS.aspx, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos MSDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

Información para emergencias disponible las 24 horas

Puede obtenerse información médica de emergencia en inglés, francés y alemán las 24 horas del día en:

Centro de información toxicológica de Maguncia, Alemania

Tel.: +49-6131-19240

Precauciones generales

El usuario debe proceder siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- Utilice puntas de pipeta exentas de DNAsa, RNAsa y ADN con filtros y asegúrese de que las pipetas se han calibrado según las instrucciones del fabricante.
- Almacene y extraiga el material positivo (muestras y controles positivos) por separado del resto de reactivos y añádalo a la mezcla de reacción en una zona separada físicamente.
- Descongele bien todos los componentes a temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C) antes de iniciar un ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifúquelos brevemente.

Nota: extreme la precaución para evitar la contaminación de las reacciones de PCR con material de control sintético. Es recomendable usar pipetas específicas independientes para preparar las mezclas de reacción y añadir ADN molde. La preparación y dispensación de las mezclas de reacción deben realizarse en una zona separada de la zona donde se añade el molde. Los tubos de Rotor-Gene Q no se deben abrir después de haber finalizado la serie PCR. Con ello, se evita la contaminación del laboratorio con productos posteriores a la PCR.

Nota: los reactivos están validados para la configuración manual. Si se utiliza un método automatizado, podría reducirse el número de posibles reacciones, debido al reactivo necesario para rellenar "volúmenes muertos" en estos instrumentos.

Nota: todos los reactivos del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se han formulado específicamente para su uso con las pruebas mencionadas. Todos los reactivos suministrados con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Para mantener un rendimiento óptimo de los reactivos del kit, no los sustituya.

Nota: utilice únicamente la Taq ADN polimerasa (Taq) suministrada con el kit. No la sustituya por Taq ADN polimerasa de otros kits del mismo o de otro tipo ni por Taq ADN polimerasa de otro fabricante.

Nota: los reactivos del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR presentan una dilución óptima. No se recomienda una mayor dilución de los reactivos puesto que estos podrían perder eficacia. No se recomienda utilizar volúmenes de reacción inferiores a 25 µl, puesto que su uso aumenta el riesgo de falsos negativos.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se suministra en hielo seco y debe mantenerse congelado a la llegada. En caso de que el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR no esté congelado a la llegada, de que el embalaje externo se haya abierto durante el transporte o de que el envío no incluya la nota de embalaje, el manual o los reactivos, póngase en contacto con los departamentos del servicio técnico de QIAGEN (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Una vez recibido, almacene inmediatamente el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR en un congelador a una temperatura constante de entre -15 °C y -25 °C y protéjalo de la luz. Cuando se almacena en las condiciones recomendadas en el embalaje original, el kit es estable hasta la fecha de caducidad que figura en la caja. No es aconsejable descongelarlo y volver luego a congelarlo. Se recomienda un máximo de 7 ciclos de congelación-descongelación.

Nota: para garantizar una actividad y un rendimiento óptimos, los cebadores Scorpions (así como todas las moléculas marcadas con fluorescencia) deben protegerse de la luz para evitar el blanqueamiento.

Nota: las muestras deben distribuirse en lotes para lograr un uso óptimo de los reactivos del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Si las muestras se analizan por separado, se utilizarán más reactivos y será necesario disminuir el número de muestras que se pueden analizar con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

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

Manipulación y almacenamiento de muestras

Nota: todas las muestras deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

El material de las muestras debe ser ADN genómico humano, obtenido de muestras de cáncer de pulmón no microcítico fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE). Las muestras se deben transportar de acuerdo con la metodología anatomopatológica estándar para garantizar la calidad de las muestras.

Existe la posibilidad de que las muestras de tumores y los datos de una muestra de tumor no coincidan con otras secciones del mismo tumor. Las muestras de tumores también pueden contener tejido no tumoral. En un principio, no se prevé que el ADN del tejido no tumoral contenga las mutaciones del gen EGFR que detecta el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Procedimiento

Determinación del nivel de células tumorales requeridas para el análisis del gen EGFR

El tejido utilizado para realizar el análisis del gen EGFR es tejido obtenido de muestras de cáncer de pulmón no microcítico fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE). El ADN extraído de células con este tejido tumoral puede ser normal respecto a las mutaciones del gen EGFR o bien puede presentar una o más mutaciones.

El tejido NSCLC FFPE utilizado para la extracción también puede contener tejido regular no tumoral, que será normal respecto a las mutaciones del gen EGFR. El ADN normal de este tejido puede diluir el ADN mutante, potencialmente hasta un nivel no detectable por el kit. Sin embargo, se recomienda analizar incluso las muestras con niveles tumorales bajos, ya que se pueden detectar mutaciones de nivel alto que permitan tomar una decisión respecto al tratamiento del paciente.

Para maximizar las posibilidades de detectar mutaciones, proceda tal como se indica a continuación.

- Realice una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de al menos uno de los portaobjetos de cada muestra de paciente.
- Asegúrese de que un patólogo revisa el portaobjetos teñido para comprobar si hay presencia tumoral.
- Si es posible, el patólogo debe revisar varios portaobjetos del bloque de muestras FFPE.

- Todas las muestras tumorales se pueden analizar con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Aislamiento de ADN

El aislamiento de ADN debe realizarse con el kit QIAamp® DNA FFPE Tissue.

Lleve a cabo la purificación del ADN de acuerdo con las instrucciones que aparecen en el Manual del kit QIAamp DNA FFPE Tissue (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) con los cambios siguientes:

- Los cortes de FFPE deben colocarse en un portaobjetos de vidrio.
- El exceso de parafina localizado alrededor de los cortes tisulares debe retirarse mediante un bisturí estéril nuevo.
- El corte tisular debe depositarse en los tubos de microcentrifuga utilizando un bisturí nuevo para cada muestra que se vaya a extraer.
- La digestión de la proteinasa K debe realizarse durante 1 hora.
- El ADN genómico purificado debe eluirse en 200 µl de tampón ATE (suministrado en el kit QIAamp DNA FFPE Tissue).
- Almacene el ADN genómico purificado a una temperatura de entre -15 °C y -30 °C.
- Si la información está disponible, deben utilizarse los portaobjetos adyacentes al portaobjetos teñido con H&E que contengan un mayor contenido tumoral.

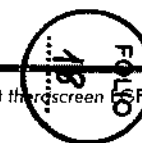
Nota: todos los ensayos del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR generan productos de PCR cortos. Sin embargo, el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR no funciona correctamente con un ADN excesivamente fragmentado.

Protocolo: valoración de las muestras

Este protocolo se utiliza para valorar el ADN total amplificable de las muestras.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de iniciar el procedimiento, consulte el apartado "Precauciones generales" en la página 11.
- Tómese su tiempo para familiarizarse con el instrumento Rotor-Gene Q antes de comenzar el protocolo. Consulte el manual del usuario del instrumento.
- No mezcle en vórtex la enzima Taq ADN polimerasa (Taq) ni ninguna otra mezcla que contenga Taq ADN polimerasa (Taq), ya que esto inactiva la enzima.



13
E
S
S

MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLOGÍA



- Pipetee la enzima Taq ADN polimerasa (Taq). Para ello, introduzca la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra de enzima en exceso.

Antes de comenzar

- Antes de cada uso, es necesario descongelar completamente todos los reactivos a temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C), mezclarlos invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifugarlos brevemente para recoger el contenido de la parte inferior del tubo.
- Asegúrese de que la enzima Taq ADN polimerasa (Taq) alcance la temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C) antes de cada uso. Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en la parte inferior del tubo.

Procedimiento

1. Descongele la mezcla de reacción para control (Ctrl), el agua exenta de nucleasas para el control sin molde (NTC) y el control positivo (PC) de EGFR a temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C). Cuando se hayan descongelado los reactivos, mézclelos invirtiendo cada tubo 10 veces para evitar concentraciones localizadas de sales. A continuación, centrifúguelos brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo.
2. Prepare cantidades suficientes de mezclas maestras para las muestras de ADN, una reacción de control positivo y una reacción de control sin molde según los volúmenes de la Tabla 1. Incluya reactivos para una muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR.

La mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios para la PCR, salvo la muestra.

Tabla 1. Preparación de la mezcla maestra de ensayo para control*

Componente	Volumen/Reacción (µl)
Mezcla de reacción para control (Ctrl)	19,5
Taq ADN polimerasa (Taq)	0,5
Volumen total	20,0

* Cuando haga la mezcla maestra, no olvide preparar la cantidad suficiente para una muestra adicional.

3. Mezcle bien la mezcla maestra pipeteando suavemente arriba y abajo 10 veces. Añada inmediatamente 20 µl de mezcla maestra al tubo de tira de PCR (no suministrado).

Nota: para la valoración de muestras, la mezcla maestra para ensayo de control debe añadirse a un pocillo de control positivo, un pocillo de control negativo y un pocillo por cada muestra.

4. Añada inmediatamente 5 µl de la muestra de agua exenta de nucleasas (H₂O) al tubo de control sin molde (número del tubo de PCR: 9) y tápelo. Añada 5 µl de ADN de la muestra a los tubos de muestra y tápelos. Añada 5 µl de control positivo (PC) de EGFR al tubo de control positivo (tubo de PCR 1) y tápelo.
5. Coloque los tubos de tiras de PCR en las posiciones apropiadas del rotor y compruebe visualmente que todos los tubos contienen un volumen idéntico.
Nota: asegúrese de que las tiras de los tubos no están al revés cuando las transfiera al rotor.
6. Si el rotor no está lleno, rellene los espacios restantes con tubos vacíos tapados.
7. Coloque inmediatamente el rotor de 72 pocillos en el equipo Rotor-Gene Q 5plex HRM. Asegúrese de que el anillo de fijación (accesorio del instrumento Rotor-Gene Q) se encuentra en la parte superior del rotor para proteger los tubos durante la serie.
8. Consulte la configuración del instrumento Rotor-Gene Q ("Protocolo: configuración del instrumento Rotor-Gene Q EGFR", en la página 20) para crear el perfil de temperatura e iniciar la serie.

Tabla 2. Parámetros de ciclo

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Obtención de datos
1	95 °C	15 minutos	Ninguno
40	95 °C	30 segundos	Ninguno
	60 °C	60 segundos	Verde y amarillo

9. Una vez finalizada la serie, analice los datos según las indicaciones del apartado "Análisis de los datos de valoración de las muestras", en la página 30.

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

Protocolo: detección de mutaciones de EGFR

Este protocolo está diseñado para la detección de mutaciones de EGFR. Cuando una muestra es correcta según la evaluación de muestras, se puede analizar mediante los ensayos de mutación de EGFR.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de iniciar el procedimiento, consulte el apartado "Precauciones generales" en la página 11.
- Tómese su tiempo para familiarizarse con el instrumento Rotor-Gene Q antes de comenzar el protocolo. Consulte el manual del usuario del instrumento.
- No mezcle en vórtex la enzima Taq ADN polimerasa (Taq) ni ninguna otra mezcla que contenga Taq ADN polimerasa, ya que esto inactivaría la enzima.
- Para utilizar el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR de forma eficaz, es preciso agrupar las muestras en lotes de 7 para rellenar un rotor de 72 pocillos. Un tamaño de lote inferior implica una capacidad de análisis de muestras inferior con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Pipetee la enzima Taq. Para ello, introduzca la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra de enzima en exceso.
- Para cada muestra de ADN, los ensayos de control y de mutación deben analizarse en la misma serie de PCR, a fin de evitar variaciones entre series analíticas.

Antes de comenzar

- Antes de cada uso, es necesario descongelar completamente todos los reactivos a temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C), mezclarlos invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifugarlos brevemente para recoger el contenido de la parte inferior del tubo.
- Asegúrese de que la enzima Taq se encuentra a temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C) antes de cada uso. Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en la parte inferior del tubo.

Procedimiento

1. **Descongele las mezclas de reacción, el agua exenta de nucleasas para el control sin molde (NTC) y el control positivo (PC) de EGFR a temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C). Cuando se hayan descongelado los reactivos, mézclelos invirtiendo cada tubo 10 veces para evitar concentraciones localizadas de sales. A continuación,**

centrifúguelos brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo.

2. **Prepare cantidades suficientes de mezclas maestras para las muestras de ADN, una reacción de control positivo y una reacción de control sin molde según los volúmenes de la Tabla 3. Incluya reactivos para una muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR.**

La mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios para la PCR, salvo la muestra.

Tabla 3. Preparación de las mezclas maestras*

Componente	Volumen/Reacción (µl)
Mezcla de reacción	19,5
Taq ADN polimerasa (Taq)	0,5
Volumen total	20,0

* Cuando haga la mezcla maestra, no olvide preparar la cantidad suficiente para una muestra adicional.

3. **Mezcle bien cada mezcla maestra pipeteando suavemente arriba y abajo 10 veces. Añada inmediatamente 20 µl de mezcla maestra a cada tubo de tira de PCR (no suministrada).**
4. **Añada inmediatamente 5 µl de agua exenta de nucleasas (H₂O) a los tubos de tiras de PCR de control sin molde (números de los tubos de PCR: del 9 al 16) y tápelos. Añada 5 µl de cada muestra a los tubos de muestra (tubos de PCR: del 17 al 72) y tápelos. Añada 5 µl de control positivo (PC) de EGFR a los tubos de control positivo (números de los tubos de PCR: del 1 al 8) y tápelos. Cada muestra de ADN se debe analizar tanto con el ensayo de control como con el ensayo de mutación. Los detalles se muestran en la Tabla 4.**

1
3
5
5

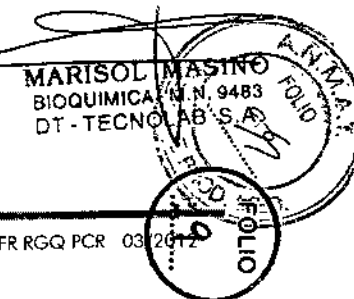


Tabla 4. Disposición de los ensayos de control y mutación

Ensayo	Controles		Número de muestras						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Ctrl	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Deleciones	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Inserciones	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Coloque los tubos de tiras de PCR en las posiciones apropiadas del rotor y compruebe visualmente que todos los tubos contienen un volumen idéntico.
Nota: asegúrese de que las tiras de los tubos no están al revés cuando las transfiera al rotor.
- Si el rotor no está lleno, rellene los espacios restantes con tubos vacíos tapados.
- Coloque inmediatamente el rotor en el instrumento Rotor-Gene Q Splex HRM. Asegúrese de que el anillo de fijación (accesorio del instrumento Rotor-Gene Q) se encuentra en la parte superior del rotor para proteger los tubos durante la serie.
- Consulte la configuración del instrumento Rotor-Gene Q ("Protocolo: configuración del instrumento Rotor-Gene Q EGFR", en la página 20) para crear el perfil de temperatura e iniciar la serie.

Tabla 5. Parámetros de ciclo

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Obtención de datos
1	95 °C	15 minutos	Ninguno
40	95 °C	30 segundos	Ninguno
	60 °C	60 segundos	Verde y amarillo

- Una vez finalizada la serie, analice los datos según las indicaciones del apartado "Análisis de los datos de mutación de EGFR", en la página 34.■

Protocolo: configuración del instrumento Rotor-Gene Q EGFR

Este protocolo se describe en los apartados "Protocolo: valoración de las muestras", en la página 14, y "Protocolo: detección de mutaciones de EGFR", en la página 17.

Procedimiento

- Cree un perfil de temperatura según los pasos que se describen a continuación.

Configuración de los parámetros generales del ensayo	Ilustraciones 1–3
Activación inicial de la enzima para Hot-Start	Ilustración 4
Amplificación del ADN	Ilustraciones 5–7
Ajuste de los canales de fluorescencia	Ilustraciones 8–12
Inicio de la serie	Ilustración 13

En resumen, los parámetros de ciclo son los siguientes.

Tabla 6. Parámetros de ciclo

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Obtención de datos
1	95 °C	15 minutos	Ninguno
40	95 °C	30 segundos	Ninguno
	60 °C	60 segundos	Verde y amarillo

Todos las especificaciones hacen referencia al software Rotor-Gene Q, versión 2.0.2. Encontrará más información sobre cómo programar los instrumentos Rotor-Gene en el manual del usuario del instrumento. En las ilustraciones, estos parámetros de configuración se resaltan dentro de un cuadro en negrita.

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

2. Haga doble clic en el icono del software Rotor-Gene Q, versión 2.0.2, situado en el escritorio del ordenador conectado al instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM. Seleccione la pestaña "Advanced" (Avanzado) dentro del cuadro de diálogo "New Run" (Nuevo serie) que se muestra.
3. Para crear un nuevo molde, seleccione "Empty Run" (Serie vacía) y haga clic en "New" (Nueva) para acceder al "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas).
4. Seleccione 72-Well Rotor (Rotor de 72 pocillos) como tipo de rotor. Confirme que el anillo de fijación esté sujeto y marque la casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de fijación sujeto). Haga clic en "Next" (Siguiente) (Ilustración 1).

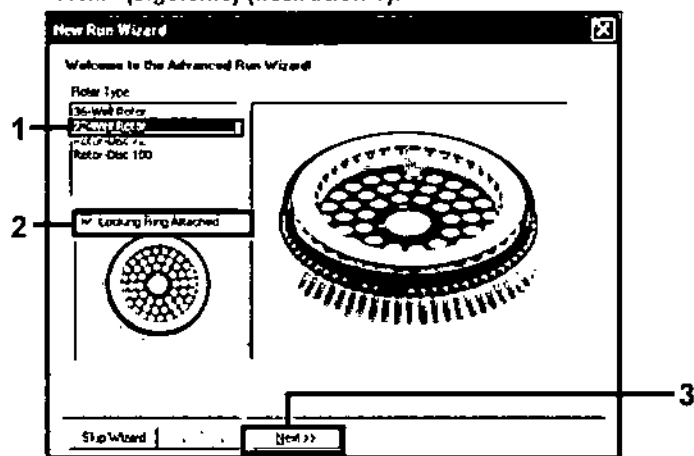


Ilustración 1. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas)

5. Introduzca el nombre del usuario. Añada las notas que desee e introduzca el volumen de reacción como 25. Asegúrese de que "Sample Layout" (Disposición de muestras) indica "1,2,3...". Haga clic en "Next" (Siguiente) (Ilustración 2).

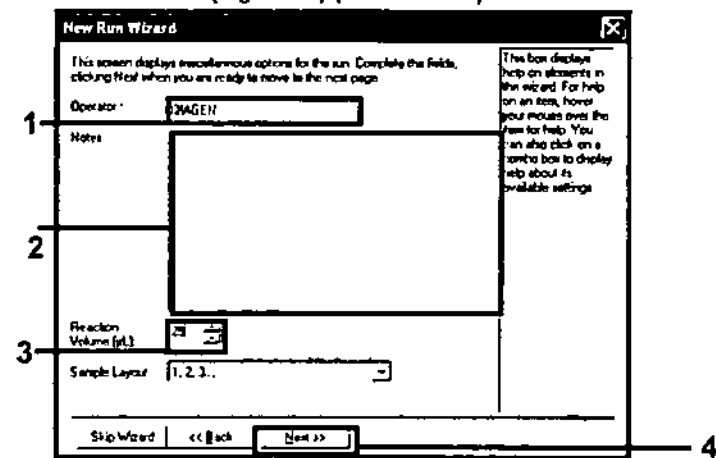
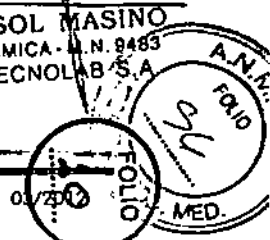


Ilustración 2. Configuración de los parámetros generales del ensayo

1325

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



6. Haga clic en el botón "Edit Profile" (Editar perfil) situado en el siguiente cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) (Ilustración 3), y siga los pasos siguientes para programar el perfil de temperatura.

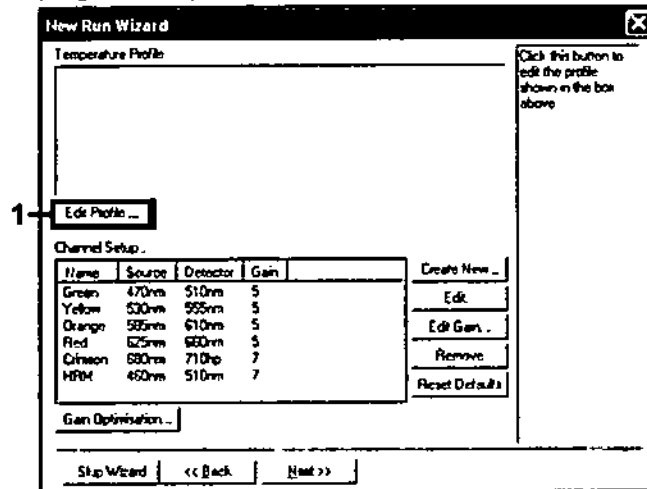


Ilustración 3. Edición del perfil

7. Haga clic en el botón "Insert after" (Insertar después) y seleccione **New Hold at Temperature** (Nueva fase de temperatura) (Ilustración 4).

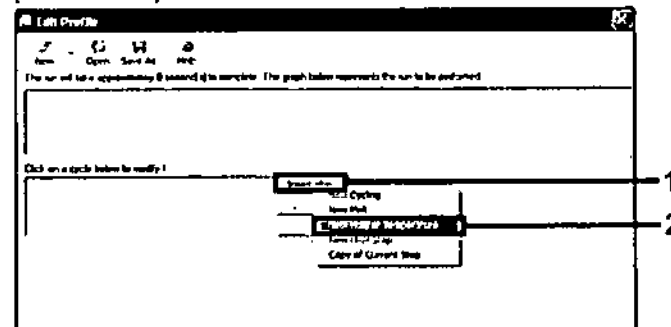


Ilustración 4. Paso de incubación inicial a 95 °C

8. Cambie el valor de "Hold Temperature" (Mantener temperatura) a 95 °C y "Hold Time" (Mantener tiempo) en 15 min. Haga clic en el botón "Insert After" (Insertar después) y seleccione **New Cycling** (Ciclos nuevos) (Ilustración 5).

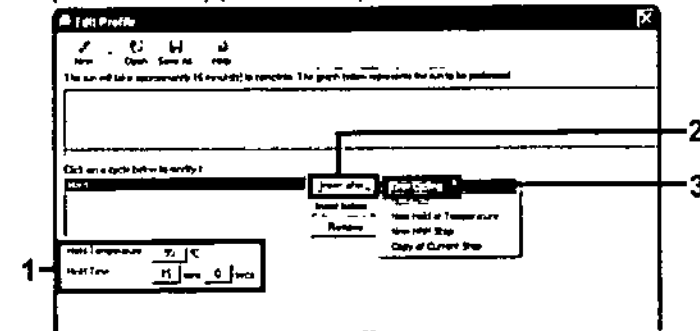


Ilustración 5. Paso de incubación inicial a 95 °C

9. Cambie el número de repeticiones de ciclo a 40. Seleccione el primer paso y establezca el valor en 95°C for 30 secs (95 °C para 30 s) (Ilustración 6).

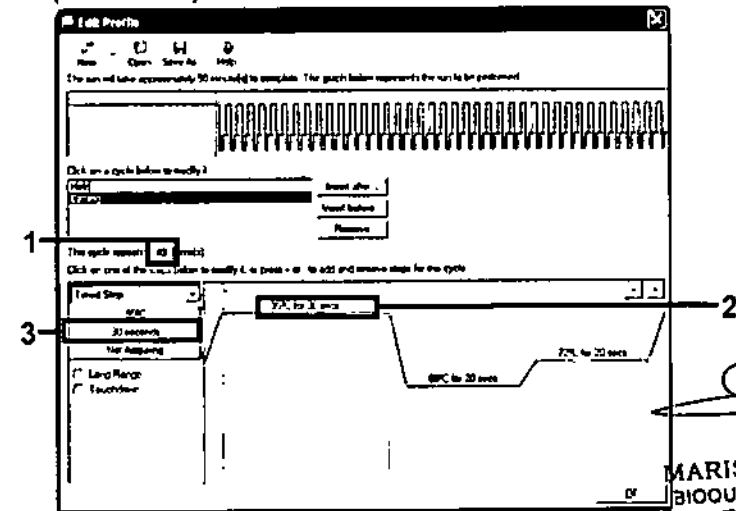


Ilustración 6. Paso de ciclado a 95 °C

10. Seleccione el segundo paso y establezca el valor en 60°C for 60 secs (60 °C para 60 s). Para activar la obtención de datos durante este

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

paso, seleccione el botón "Not Acquiring" (No adquirir) (Ilustración 7).

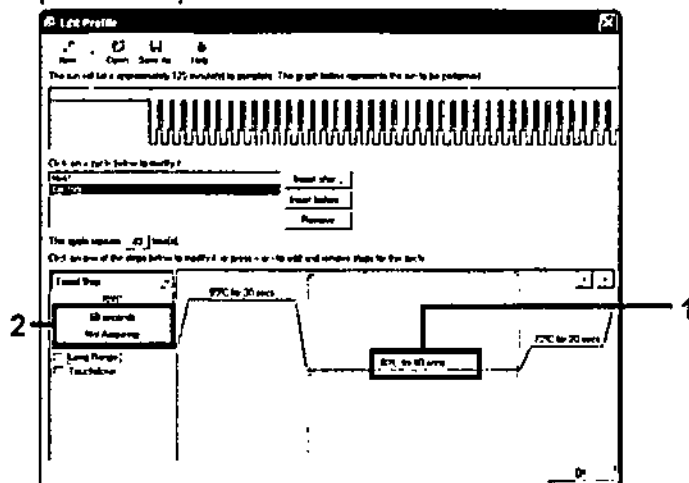


Ilustración 7. Paso de ciclado a 60 °C

11. Establezca Green (Verde) y Yellow (Amarillo) como canales de obtención. Para ello, seleccione el botón ">" para transferirlos de la lista "Available Channels" (Canales disponibles). Haga clic en "OK" (Aceptar) (Ilustración 8).

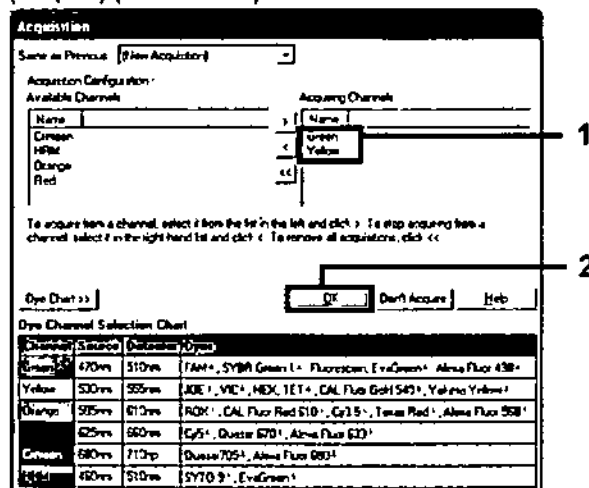


Ilustración 8. Adquisición en el paso de ciclado a 60 °C

12. Seleccione el tercer paso y elimínelo mediante el botón "-". Haga clic en "OK" (Aceptar) (Ilustración 9).

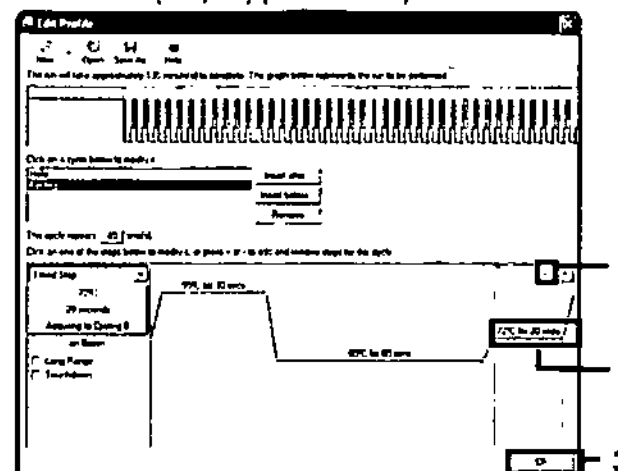


Ilustración 9. Eliminación del paso de extensión

13. En el cuadro de diálogo siguiente, haga clic en el botón "Gain Optimisation" (Optimización de ganancia) (Ilustración 10).

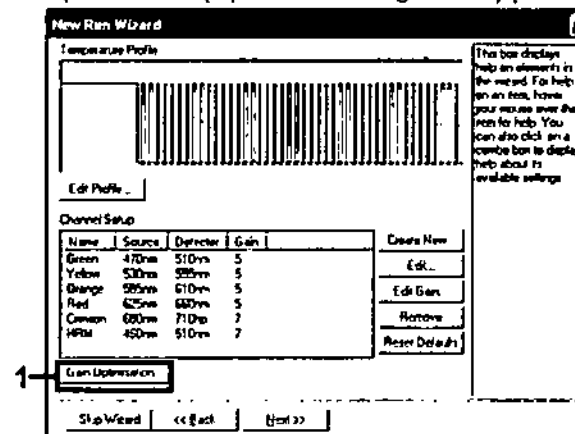
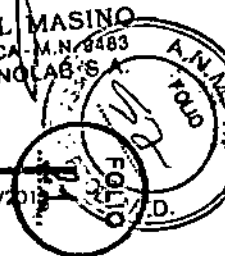


Ilustración 10. Optimización de la ganancia

1355
MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 8483
DT-TECNOLOGIA S.A.



14. Haga clic en el botón "Optimise Acquiring" (Adquirir optimización). A continuación, se muestra la configuración de canal para cada canal. Acepte los valores predeterminados haciendo clic en "OK" (Aceptar) para ambos canales (Ilustración 11).

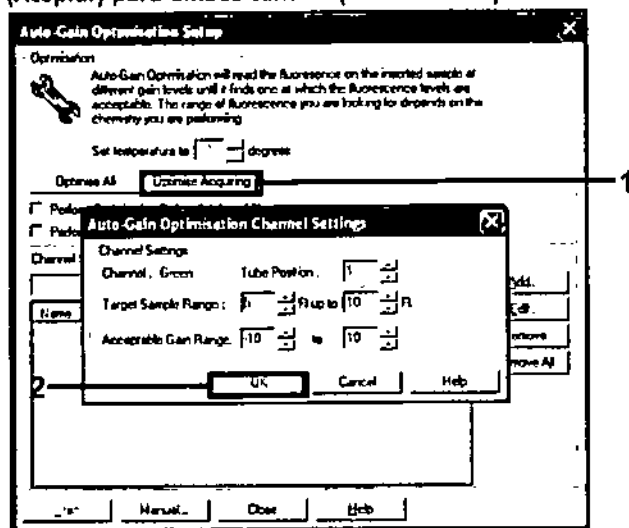


Ilustración 11. Optimización de la ganancia automática para el canal verde

15. Active la casilla "Perform Optimisation before 1st Acquisition" (Ejecutar la optimización antes de la primera adquisición) y, a continuación, haga clic en el botón "Close" (Cerrar) para volver al asistente (Ilustración 12).

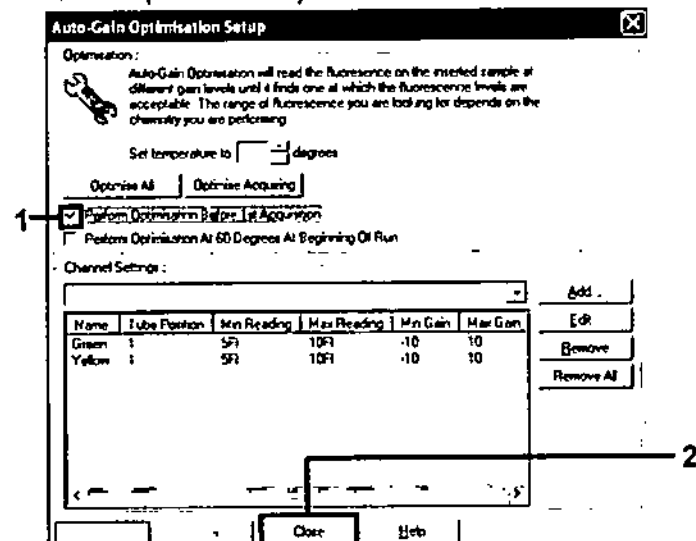
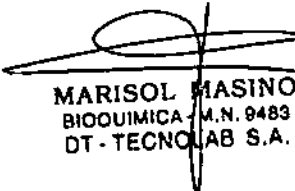


Ilustración 12. Selección de los canales verde y amarillo

16. Haga clic en "Next" (Siguiente) para guardar el molde en una ubicación apropiada. Para ello, seleccione "Save Template" (Guardar molde).


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

17. Compruebe el resumen y haga clic en "Start Run" (Iniciar la serie) para guardar el archivo de análisis y comenzar la serie (Ilustración 13).

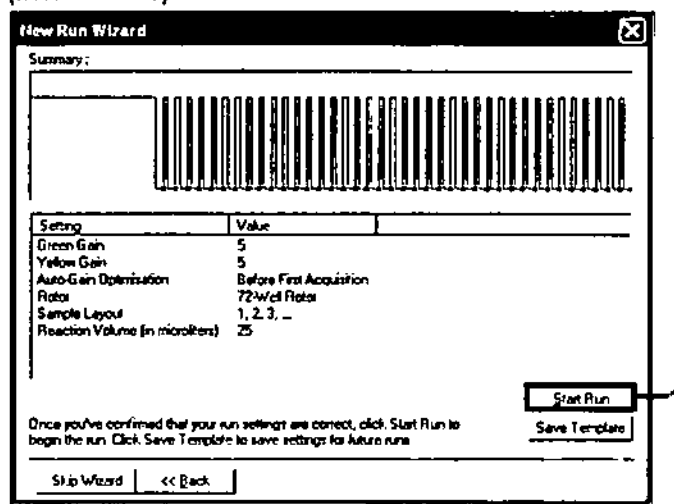


Ilustración 13. Inicio de la serie

18. Una vez iniciada la serie, aparece una nueva ventana en la que puede introducir nombres de muestra en ese momento o bien hacer clic en "Finish" (Finalizar) e introducirlos más tarde seleccionando el botón "Sample" (Muestra) durante la ejecución de la serie o una vez completada.
19. Una vez finalizada la serie, debe analizar los datos según el protocolo apropiado:
- Para la valoración de las muestras, consulte el apartado "Análisis de los datos de valoración de las muestras", en la página 30.
 - Para el análisis de mutaciones, consulte el apartado "Análisis de los datos de mutación de EGFR", en la página 34.

Interpretación de los resultados

Método de análisis de ΔC_T

Los ensayos en tiempo real de Scorpions utilizan el número de ciclos de PCR necesarios para detectar una señal de fluorescencia superior a la señal de fondo como medida de las moléculas objetivo presentes al comienzo de la reacción. El punto en el que se detecta una señal superior a la lectura de fluorescencia de fondo se denomina "ciclo umbral" (C_T).

Los valores de ΔC_T de una muestra se calculan como la diferencia entre el valor de C_T del ensayo de mutación y el valor de C_T del ensayo de control de una misma muestra:

$$\Delta C_T = C_T \text{ de mutación} - C_T \text{ de control}$$

Nota: las muestras se clasifican como positivas para mutaciones si su valor de ΔC_T es inferior al valor de ΔC_T de corte correspondiente a dicho ensayo. Por encima de este valor, se considera que la muestra no alcanza el porcentaje de mutación detectable por el kit (por encima del límite de los ensayos) o que la muestra es negativa para la mutación.

Nota: los valores de C_T de la mutación de 40 o superiores se consideran negativos o por encima de los límites del kit.

Si se utilizan cebadores ARMS, es posible que el cebado no resulte eficaz, lo que daría lugar a un valor de C_T de fondo muy tardío para secuencias de ADN que no contengan mutaciones. Todos los valores de ΔC_T calculados a partir de la amplificación del fondo serán superiores a los valores de ΔC_T de corte y la muestra se clasificará como negativa para la mutación.

Análisis de los datos de valoración de las muestras

Una vez completada la serie, debe analizar los datos según el siguiente procedimiento.

Configuración del análisis del software

1. Utilice la versión del software Rotor-Gene Q 2.0.2 o superior para abrir el archivo adecuado.
2. Compruebe que las muestras incluyen etiquetas.
3. Cuando esté en la página del canal inicial de cada detector/canal, haga clic en "Options" (Opciones) y acceda a *Crop start cycles* (Borrar ciclos de inicio). En la página que muestra "Remove data before cycle" (Eliminar los datos antes del ciclo), introduzca 15 y haga clic en "OK" (Aceptar).

4. Haga clic en "Analysis" (Análisis). En la página de análisis, haga clic en "Cycling A (from 15), Yellow" (Ciclado A (desde 15), amarillo) para comprobar el canal HEX.
5. Compruebe que la opción "tubo dinámico" está resaltada. Haga clic en "Slope correct" (Pendiente correcta) y "Linear scale" (Escala lineal).
6. Configure el umbral en 0,02 y compruebe los valores de C_T de HEX.
7. En la página de análisis, haga clic en "Cycling A (from 15), Green" (Ciclado A (desde 15), verde) para ver el canal FAM.
8. El tubo dinámico debe aparecer marcado. Haga clic en "Slope correct" (Pendiente correcta) y "Linear scale" (Escala lineal).
9. Configure el umbral en 0,075 y compruebe los valores de C_T de FAM.

Una vez finalizada la serie, debe analizar los datos tal y como se indica a continuación.

- **Control negativo:** para garantizar que el molde no está contaminado, el NTC no debe generar un valor de C_T en el canal verde (FAM) por debajo de 40. Consulte el apartado "Notas para la interpretación de los datos" de la página 40 para obtener información importante sobre el análisis de los gráficos de control sin molde (NTC). Para garantizar que la serie está configurada correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación de 31 a 37 en el canal amarillo (HEX).

No utilice los resultados de la muestra si existe amplificación positiva en el canal verde y/o una amplificación fuera del rango de 31 a 37 en la señal amarilla.

- **Control positivo:** el control positivo (PC) de EGFR debe generar un valor de C_T del ensayo de control (canal FAM) comprendido entre 26,26 y 30,95. Una serie con un valor de C_T fuera de este rango indica un problema de configuración en el ensayo, por lo que la serie debe señalarse como errónea. Si el valor de C_T del ensayo de control positivo está comprendido entre 26,26 y 30,95 (exón 2, FAM), pero en valor de C_T del control interno (HEX) se encuentra fuera del rango de 31 a 37, puede continuar con el análisis.

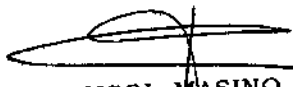
Nota: no deben utilizarse los datos de las muestras si alguno de estos dos controles de análisis da error.

Siempre que ambos controles de series sean válidos, cada valor de C_T de la muestra debe estar comprendido en el rango de 23 a 30,69 en el canal verde (FAM). Si la muestra se encuentra fuera de este rango, se proporciona la guía siguiente.

- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra <23:** las muestras con un valor de C_T de control <23 sobrecargarán los ensayos de mutación y deben diluirse. Para detectar cada mutación en un nivel bajo, las muestras sobreconcentradas se deben diluir para que se encuentren en el rango mencionado anteriormente, partiendo de la base de que diluir a la mitad aumentará el valor de C_T en 1.
- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra comprendido entre 30,69 y 37:** interprete con precaución los datos, ya que es posible que no se hayan detectado las mutaciones de nivel bajo.
- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra comprendido entre 37 y 40:** interprete con precaución los datos, ya que únicamente se detectarán las mutaciones de nivel muy alto.
- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra >40:** la muestra no contiene una cantidad suficiente de ADN para realizar el análisis.

Nota: si una muestra no genera un valor de C_T (es decir, $C_T > 40$), puede deberse a la presencia de un inhibidor, a un error en la configuración del ensayo o a que no hay ADN amplificable de EGFR.

- **Valor de C_T del control interno de 31 a 37:** no hay ADN amplificable de EGFR.
- **Valor de C_T del control interno fuera del rango de 31 a 37:** podría indicar un error de configuración del ensayo o la presencia de un inhibidor. El efecto del inhibidor se puede reducir diluyendo la muestra, aunque esto también diluirá el ADN.


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

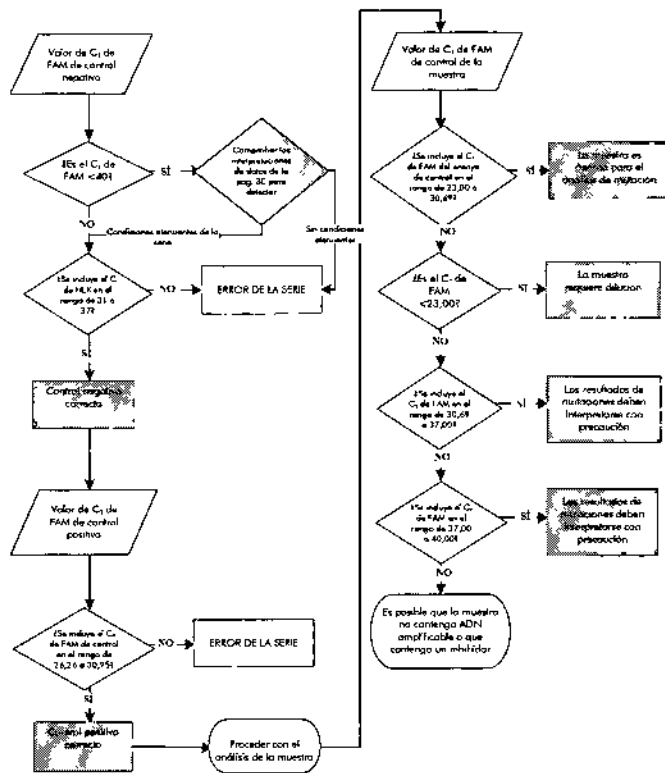


Ilustración 14. Flujo de trabajo del análisis de valoración de las muestras

Análisis de los datos de mutación de EGFR

Una vez completada la serie, debe analizar los datos según el siguiente procedimiento.

Configuración del análisis del software

1. Utilice la versión del software Rotor-Gene Q 2.0.2 o superior para abrir el archivo adecuado.
2. Compruebe que las muestras incluyen etiquetas.
3. Cuando esté en la página del canal inicial de cada detector/canal, haga clic en "Options" (Opciones) y acceda a **Crop start cycles** (Borrar ciclos de inicio). En la página que muestra "Remove data before cycle" (Eliminar los datos antes del ciclo), introduzca 15 y haga clic en "OK" (Aceptar).
4. Haga clic en "Analysis" (Análisis). En la página de análisis, haga clic en "Cycling A (from 15), Yellow" (Ciclado A (desde 15), amarillo) para ver el canal HEX.
5. Compruebe que la opción "tubo dinámico" está resaltada. Haga clic en "Slope correct" (Pendiente correcta) y "Linear scale" (Escala lineal).
6. Configure el umbral en 0,02 y compruebe los valores de C_T de HEX.
7. En la página de análisis, haga clic en "Cycling A (from 15), Green" (Ciclado A (desde 15), verde) para ver el canal FAM.
8. Compruebe que la opción "tubo dinámico" está resaltada. Haga clic en "Slope correct" (Pendiente correcta) y "Linear scale" (Escala lineal).
9. Configure el umbral en 0,075 y compruebe los valores de C_T de FAM.

Análisis de control de la serie:

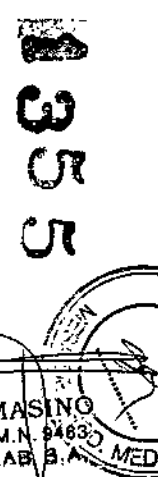
Consulte el organigrama "Análisis de control de la serie" en la Ilustración 15.

- **Control negativo:** para garantizar que el molde no está contaminado, el NTC no debe generar un valor de C_T en el canal verde (FAM) por debajo de 40. Consulte el apartado "Notas para la interpretación de los datos" de la página 40 para obtener información importante sobre el análisis de los gráficos de control sin molde (NTC). Para garantizar que la serie está configurada correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación de C_T de 31 a 37 en el canal amarillo (HEX).

No utilice los resultados de la muestra si existe amplificación positiva en el canal verde y/o una amplificación fuera del rango de 31 a 37 en la señal amarilla.



MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 84632
DT - TECNOLOGIA B.A. MED.



- **Control positivo:** el control positivo (PC) de EGFR debe generar un valor de C_T del ensayo de control comprendido entre 26,26 y 30,95 en el canal verde. Una serie con un valor de C_T fuera de este rango indica un problema de configuración en el ensayo, por lo que la serie debe señalarse como errónea. Si el valor de C_T del ensayo de control positivo está comprendido entre 26,26 y 30,95 (exón 2, FAM), pero en valor de C_T del control interno (HEX) se encuentra fuera del rango de 31 a 37, puede continuar con el análisis.

Proceda a calcular el valor de ΔC_T de todos los pocillos de mutación tal y como se indica a continuación. Es importante utilizar los valores de C_T de mutación y de control del control positivo.

$$\Delta C_T = C_T \text{ de mutación} - C_T \text{ de control}$$

Los valores de ΔC_T de control positivo (PC) de EGFR deberían coincidir con los valores indicados en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de ΔC_T de control positivo esperados*

Ensayo	Valor de ΔC_T de control positivo
T790M	De -2,88 a 3,01
Delecciones	De -6,71 a 4,16
L858R	De -2,41 a 0,90
L861Q	De -4,61 a 1,48
G719X	De -2,89 a 1,03
S768I	De -3,37 a 2,31
Inserciones	De -2,93 a 1,28

* Software Rotor-Gene Q (2.0.2).

Nota: no deben utilizarse los datos de las muestras si los controles de análisis negativo o positivo dan error.

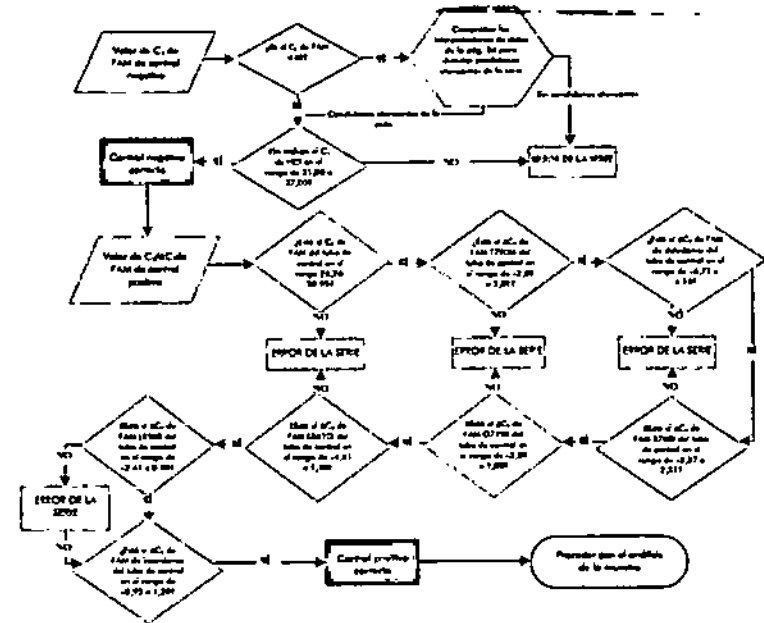


Ilustración 15. Flujo de trabajo del análisis de control de la serie

Análisis de la muestra:

Valor de C_T de FAM de control de la muestra

Siempre que ambos controles de series sean válidos, cada valor de C_T de control de la muestra debe estar comprendido en el rango de 23 a 30,69 en el canal verde. Consulte el organigrama "Análisis de la muestra" en la Ilustración 16.

- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra < 23:** las muestras con un valor de C_T de control < 23 sobrecargarán los ensayos de mutación y deben diluirse. Para detectar cada mutación en un nivel bajo, las muestras sobreconcentradas se deben diluir para que se encuentren en el rango mencionado anteriormente, partiendo de la base de que diluir a la mitad aumentará el valor de C_T en 1.
- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra en el rango de 30,69 a 37:** interprete con precaución los datos, ya que es posible que se hayan detectado las mutaciones de nivel bajo.

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

- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra en el rango de 37 a 40:** interprete con precaución los datos, ya que únicamente se detectarán las mutaciones de nivel muy alto.

- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra >40 :** la muestra no contiene una cantidad suficiente de ADN para realizar el análisis.

Nota: si el valor de C_T de FAM de la muestra se encuentra entre 23 y <37 , no es necesario evaluar el control interno.

Nota: si una muestra no genera un valor de C_T (es decir, $C_T >40$), puede deberse a la presencia de un inhibidor, a un error en la configuración del ensayo o a que no hay ADN amplificable de EGFR.

- **Valor de C_T del control interno de 31 a 37:** el ensayo funciona correctamente, pero no hay ADN amplificable de EGFR.

- **Valor de C_T del control interno fuera del rango de 31 a 37:** podría indicar un error de configuración del ensayo o la presencia de un inhibidor. El efecto del inhibidor se puede reducir diluyendo la muestra, aunque esto también diluirá el ADN.

Nota: si la reacción de FAM del ensayo de mutación no genera un valor de C_T y las reacciones de control interno generan un valor de C_T fuera del rango de 31 a 37, no deben utilizarse los datos obtenidos puesto que puede haber inhibidores que podrían generar resultados falsos negativos. La dilución de la muestra puede reducir el efecto de los inhibidores, aunque se debe tener en cuenta que esto también diluirá el ADN.

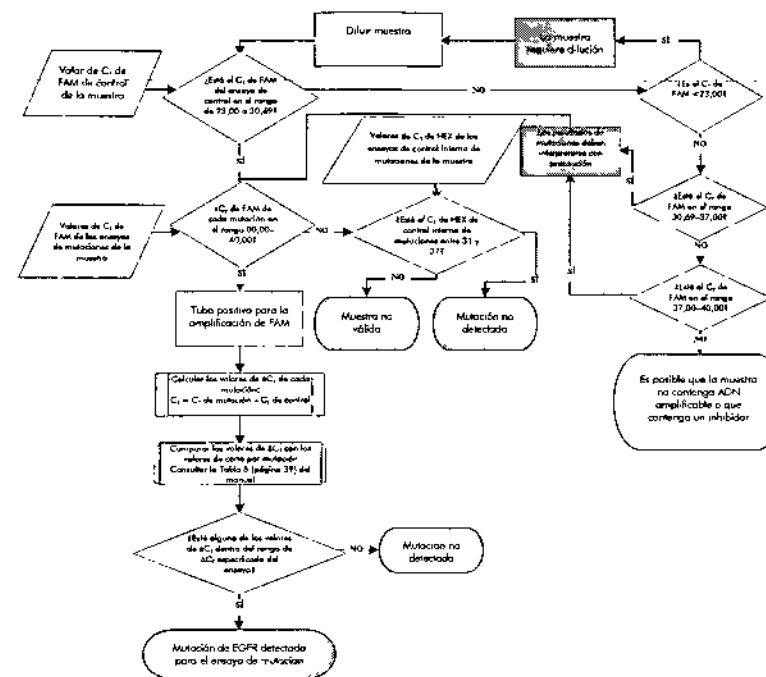


Ilustración 16. Organigrama del análisis de mutación

W
 CR
 CR
 MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA - M. N. 9483
 DT - TECNOLAB S.A. MED.
 FOLIO

Valor de C_T de FAM de los ensayos de mutaciones de la muestra

Es necesario comparar los valores de FAM de las siete mezclas para reacción de mutación con los valores que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de reacción de mutación de muestras aceptables (FAM)*

Ensayo	Rango de C_T aceptable	Valor de ΔC_T de corte
T790M	15,00–40,00	6,38
Deleciones	15,00–40,00	9,06
L858R	15,00–40,00	8,58
L861Q	15,00–40,00	9,26
G719X	15,00–40,00	9,31
S768I	15,00–40,00	9,26
Inserciones	15,00–40,00	7,91

* Los valores aceptables son los comprendidos entre los valores mostrados (también aceptables).

- Si el valor de C_T de FAM se incluye dentro del rango especificado de 15,00 a 40,00, la amplificación de FAM es positiva.
- Si el valor de C_T de FAM está por encima del rango especificado o si no existe amplificación, la amplificación de FAM es negativa.

Calcule el valor de ΔC_T para todas las muestras de mutación que presenten amplificación positiva tal y como se indica a continuación. Es importante utilizar los valores de C_T de mutación y de control de una misma muestra.

$$\Delta C_T = C_T \text{ de mutación} - C_T \text{ de control}$$

Compare el valor de ΔC_T de la muestra con el punto de corte del ensayo en cuestión (Tabla 8). Compruebe que se aplique el punto de corte correcto para cada ensayo.

El punto de corte es el punto a partir del cual una señal positiva podría ser la respuesta a una señal de fondo del cebador ARMS en ADN normal. Si el valor de ΔC_T de la muestra es superior al punto de corte, ésta se considera de "mutación no detectada" o fuera de los límites de detección del kit. Si el valor

de la muestra es el mismo que el del punto de corte o inferior, la muestra se considera positiva para la mutación objetivo del ensayo.

Nota: para las muestras que no presentan un valor de C_T de mutación de FAM, es necesario realizar una evaluación del valor de C_T de control interno (HEX) para determinar si la mutación no se detecta o si el ensayo no es válido. Si el valor de C_T de HEX se encuentra entre 31 y 37, la mutación no se detecta. Si el valor de C_T de HEX se encuentra fuera del rango de 31 a 37, la muestra no es válida.

En resumen, para cada muestra, las reacciones de mutación recibirán un estado de mutación detectada, mutación no detectada o no válida según los siguientes criterios.

- **Mutación detectada:** la amplificación positiva de FAM y el valor de ΔC_T son iguales al valor de corte o están por debajo de él. Si se detectan varias mutaciones, pueden notificarse todas.
- **Mutación no detectada:**
La amplificación positiva de FAM y el valor de ΔC_T están por encima del valor de corte.
La amplificación de FAM es negativa y la amplificación de HEX (control interno) es positiva.
- **No válido:**
La amplificación de FAM es negativa y la amplificación de HEX se encuentra fuera de las especificaciones.

Notas para la interpretación de los datos

Amplificación lineal

Es preciso que compruebe los gráficos de Rotor-Gene Q correspondientes a todas las reacciones. De vez en cuando, se observa un aumento de la señal de fluorescencia en el NTC y en las muestras negativas. Si este es el caso y se obtiene un valor de C_T , el usuario deberá distinguir entre un suceso de amplificación auténtica, que indicaría la presencia de contaminación en el NTC, y un aumento lineal en fluorescencia, posiblemente a causa de un artefacto de fluorescencia.

Análisis del NTC

En las Ilustraciones 17 y 18, se muestran dos ejemplos del comportamiento de las muestras de NTC. En la Ilustración 17, el comportamiento es no lineal (amplificación auténtica), debido a la contaminación de la muestra. Se debe descartar esta serie y volver a analizar las muestras. En la Ilustración 18, se observa una amplificación lineal en un NTC. En estas circunstancias, es preciso examinar los datos de fluorescencia iniciales. El gráfico de fluorescencia inicial

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

correspondiente se muestra en la Ilustración 19, donde se aprecia un aumento lineal de la fluorescencia, en lugar de un suceso de amplificación auténtica. Los datos de esta serie podrán utilizarse siempre y cuando sean correctas las comprobaciones de los controles positivos e internos. En comparación con la Ilustración 19, la Ilustración 20 muestra los datos de fluorescencia iniciales en los que se produjo una amplificación auténtica. En estas circunstancias, deberá descartar los datos y volver a analizar las muestras, ya que esto demuestra la existencia de contaminación.

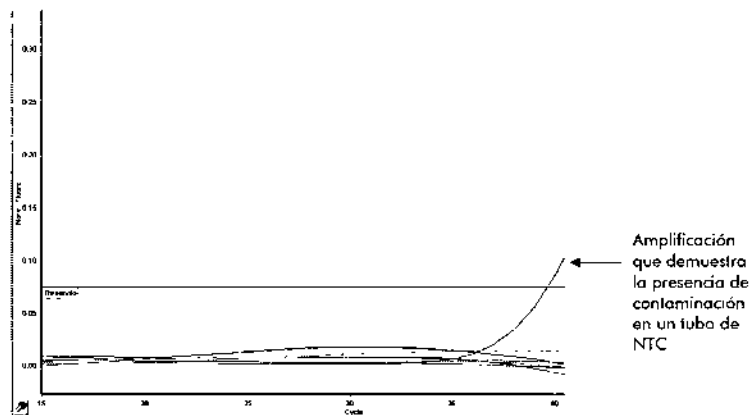


Ilustración 17. Contaminación en el NTC de un ensayo en una serie analizada

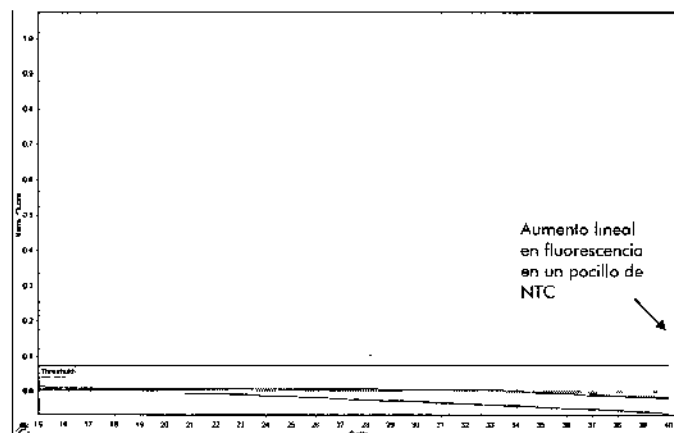


Ilustración 18. Ejemplo de aumento lineal en fluorescencia en un pocillo de NTC

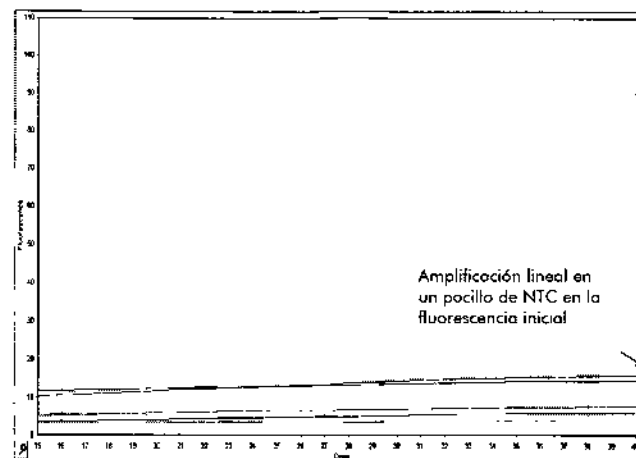


Ilustración 19. Fluorescencia inicial de la Ilustración 18

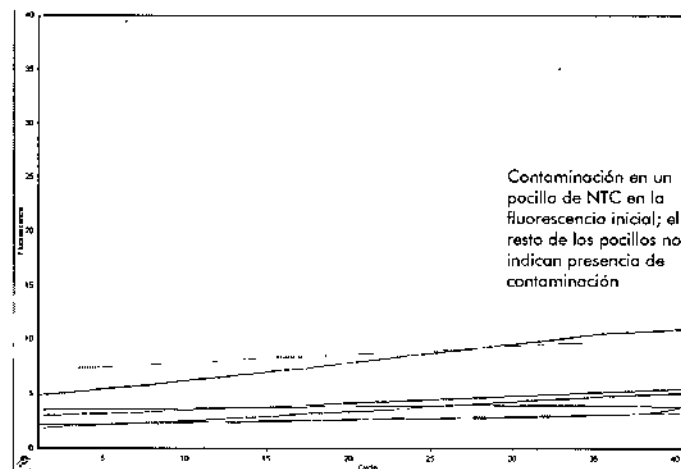
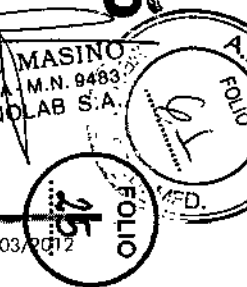


Ilustración 20. Datos de fluorescencia iniciales que indican una amplificación auténtica en un pocillo de NTC

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

1325



Análisis de las muestras

En las Ilustraciones 21 y 22 se muestran dos ejemplos de amplificación en las reacciones de muestras. En la Ilustración 21, se observa un ejemplo de amplificación auténtica en un pocillo de muestra dentro de una serie analizada. Si una serie indica este tipo de curva de amplificación sigmoide, la amplificación auténtica y los datos de esta serie podrán utilizarse, siempre y cuando sean correctas las comprobaciones de los controles positivos e internos.

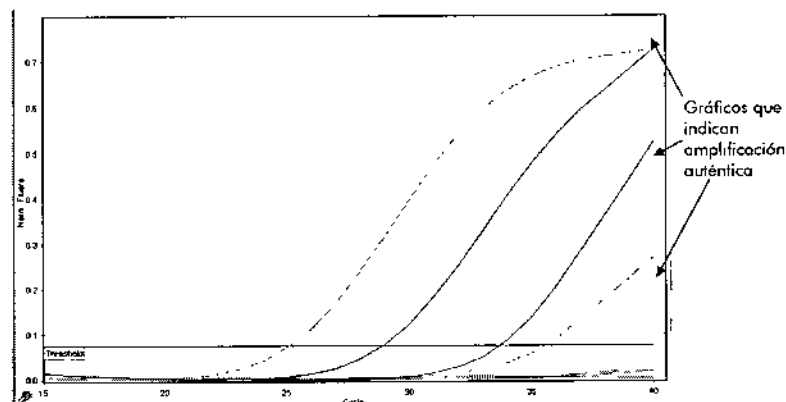


Ilustración 21. Amplificación auténtica en un pocillo de muestra de una serie analizada

En la Ilustración 22, se observa un ejemplo de amplificación lineal en una reacción de muestra. En estas circunstancias, es preciso examinar los datos de la fluorescencia iniciales. El gráfico de fluorescencia inicial correspondiente (Ilustración 23) indica que el incremento lineal observado en la Ilustración 22 corresponde a un incremento lineal de la fluorescencia inicial y no representa una amplificación auténtica. Siempre que las comprobaciones de los controles positivos e internos sean correctas, los resultados de las muestras de estas series se pueden utilizar con precaución. Este tipo de amplificación lineal se denomina "sin valor de C_T ".

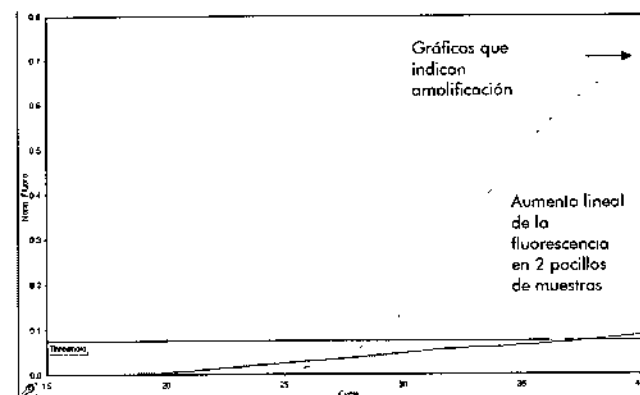


Ilustración 22. Ejemplo de aumento lineal en fluorescencia en dos pocillos de muestras

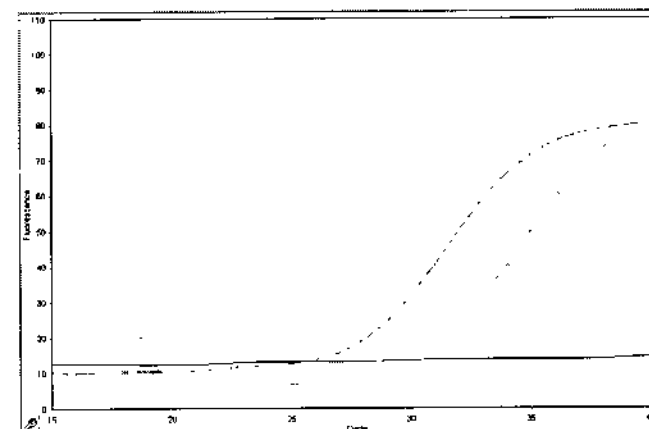



Ilustración 23. Fluorescencia inicial de la Ilustración 22


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

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas es de utilidad para resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de Preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de Servicio Técnico (Technical Support Center): www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Sin señal para el control positivo (PC) de EGFR en el canal de fluorescencia Cycling Green

- | | |
|---|--|
| a) El canal de fluorescencia seleccionado para el análisis de datos de PCR no cumple el protocolo. | Para el análisis de datos, debe seleccionar el canal de fluorescencia Cycling Green para la PCR de EGFR analítica y el canal de fluorescencia Cycling Yellow para la PCR de control interno. |
| b) La programación del perfil de temperatura del instrumento Rotor-Gene no es correcta. | Compare el perfil de temperatura con el protocolo y, si no es correcto, repita la serie. |
| c) La configuración de la PCR no es correcta. | Compruebe los pasos de trabajo por medio del esquema de pipeteo y repita la PCR en caso necesario. |
| d) Las condiciones de almacenamiento de uno o varios componentes no siguen las instrucciones indicadas en el apartado "Almacenamiento y manipulación de reactivos" (página 12). | Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (en la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario. |

Comentarios y sugerencias

- | | |
|--|---|
| e) El kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR ha caducado. | Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (en la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario. |
|--|---|

Señales con los controles negativos en el canal de fluorescencia Cycling Green de la PCR analítica

- | | |
|---|--|
| a) Se ha generado contaminación durante la preparación de la PCR. | Repita la PCR con réplicas de reactivos nuevos.
Si fuera posible, cierre los tubos de PCR justo después de añadir la muestra que va a analizarse.
Compruebe periódicamente que el espacio y los instrumentos de trabajo no están contaminados. |
| b) Se ha generado contaminación durante la extracción. | Repita la extracción y la PCR de la muestra que debe analizarse con reactivos nuevos.
Compruebe periódicamente que el espacio y los instrumentos de trabajo no están contaminados. |

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se analiza en cuanto a las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

Limitaciones

Los resultados del producto deben interpretarse dentro del contexto de todos los hallazgos clínicos o de laboratorio y no han de utilizarse independientemente para diagnóstico.

Solo el personal especialmente formado y cualificado en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* y Rotor-Gene Q puede utilizar el producto.

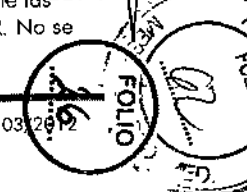
Los estudios de validación analítica han utilizado ADN humano extraído de muestras tumorales fijadas en formalina e incluidas en parafina.

El producto es para uso exclusivo en el termociclador para PCR en tiempo real de Rotor-Gene Q (serie 5plex HRM).

Para obtener unos resultados óptimos, es preciso que siga detenidamente las instrucciones indicadas en el manual del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. No se

1355

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



recomienda la dilución de reactivos distintos a los descritos en este manual. Si se utilizan, se producirá una disminución del rendimiento.

Es importante que la cantidad y calidad del ADN de la muestra se evalúe antes de realizar el análisis de la muestra con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. La mezcla de reacción para control (Ctrl) adicional se suministra para determinar si el valor de C_T es aceptable para el ensayo. Las lecturas de absorbancia no deben utilizarse, puesto que no correlacionan los valores de C_T en las muestras de ADN fragmentadas.

Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad y condiciones de almacenamiento impresas en las cajas y etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados o mal almacenados.

Características de rendimiento

Valores de corte

Se analizaron 171 muestras de FFPE utilizando un método que sigue los requerimientos de NCCLS EP17-A (2004). Se utilizaron los datos de 159 muestras para establecer los valores de corte del kit. El rango de C_T de la reacción de control se estableció de 23,00 a 30,69 de C_T . Los valores de corte se establecieron tal y como se indica en la Tabla 8.

Límite de detección (LOD)

Para determinar el LOD del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, se desarrolló un conjunto de muestras mezclando ADN mutante sintético con ADN genómico normal para simular un rango de porcentajes de mutación para cada una de las 29 mutaciones. El LOD de cada ensayo se define como el porcentaje de mutación al que el 95% de las réplicas se determinaron como positivas mediante el kit *therascreen* EGFR PCR RGQ. Los valores del LOD se proporcionan en la Tabla 9. Para los ensayos multiplex, que detectan varias mutaciones (G719X, las deleciones y las inserciones), se proporciona el valor de la reacción que obtuvo el LOD más elevado.

Tabla 9. LOD de cada uno de los siete ensayos de mutación de EGFR.

Mutación	Porcentaje de mutación detectable (%)
T790M	7,02
Deleciones	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
Inserciones	2,03

Precisión

Para determinar la precisión del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, se desarrolló un conjunto de muestras mezclando ADN mutante sintético con ADN genómico normal para simular un nivel bajo de porcentaje de mutación para cada uno de los siete ensayos de mutación. La precisión se evaluó mediante el análisis de las muestras en un único centro, utilizando varios lotes de kit, usuarios y series durante distintos días, con dos réplicas de cada muestra. La variación observada, en términos de desviación estándar estimada mediante el análisis de los componentes de la varianza, fue menor de $1 \Delta C_T$ y se puede utilizar como estimación de la precisión (Tabla 10).


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

Tabla 10. Resultados de las pruebas del laboratorio*

Ensayo	Porcentaje de los análisis de mutación positiva	Estimación de la desviación estándar (ΔC_T)
T790M	100%	0,33
Deleciones	100%	0,40
L858R	100%	0,45
L861Q	100%	0,49
G719X	97,9%	0,59
S768I	97,9%	0,31
Inserciones	97,9%	0,38

* Se analizaron 93 réplicas para cada mutación.

Reproducibilidad

La reproducibilidad se evaluó mediante el análisis de muestras con niveles de mutación elevados en un entorno de ADN genómico normal en tres centros de análisis, utilizando varios lotes de kits, usuarios y series durante distintos días, con dos réplicas de cada muestra. En los siete ensayos de mutación, entre el 96,1% y el 100% de las muestras de ADN mutantes obtuvieron resultados positivos para la mutación. Las muestras normales obtuvieron resultados negativos para la mutación en todos los ensayos de todos los centros.

Efecto de la concentración de ADN introducido

Para determinar el efecto de cambiar la concentración de ADN introducido en los resultados producidos por el kit *therascreen EGFR RGQ PCR* cercanos al LOD, se desarrolló un conjunto de muestras para las 29 mutaciones mezclando ADN mutante sintético con ADN genómico normal para producir muestras a niveles bajos, medios y altos de ADN introducido.

Los niveles altos y bajos de ADN introducido se utilizaron para representar el rango del valor de C_T (de 23,50 a 29,50) del ensayo de control.

Una valoración del conjunto de datos de ADN introducido (29 mutaciones, con concentraciones cercanas al LOD y tres niveles de ADN introducido diferentes) reveló una tasa de mutación positiva del 95,44%.

Estos datos indican que variar el nivel de ADN introducido (dentro del rango de funcionamiento del ensayo) no afecta al valor de ΔC_T ni a la mutación de una muestra.

Sustancias interferentes

Se evaluó el efecto en el rendimiento del kit de los componentes del kit QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue que podrían contaminar durante el procesamiento de las muestras de FFPE.

Se utilizaron formalina, cera de parafina, xileno, etanol, tampón ATL, proteinasa K, tampón AL, tampón de lavado AW1 y tampón de lavado AW2 en las concentraciones más altas (para "el peor de los casos") esperadas (asumiendo que cada paso de lavado o purificación del protocolo del kit de extracción derivara en una reducción del componente de concentración de 1 log).

Para garantizar la detección de interferencias potenciales, el estudio utilizó las muestras de LOD tres veces, en lugar de un nivel mucho mayor de mutación.

Se consideró que una diferencia en el valor de ΔC_T de ≥ 3 desviaciones estándar (tomada del estudio de la precisión) entre el "análisis" y el "control" (es decir, sin sustancia interferente) indicaba una posible interferencia.

Ninguna de las posibles sustancias interferentes evaluadas presentó ningún cambio en el valor de ΔC_T de ≥ 1 desviaciones estándar en comparación con los controles.

Referencias

QIAGEN mantiene una extensa base de datos en línea y actualizada de publicaciones científicas en las que se utilizan los productos de QIAGEN. Sus exhaustivas opciones de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante la búsqueda sencilla con una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica en línea de QIAGEN en www.qiagen.com/RefDB/search.asp o póngase en contacto con los servicios técnicos de QIAGEN o con su distribuidor local.

1355

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA M.N. 8483
DT - TECNO LAB S.A.

FOLIO 1355

FOLIO 1355

Símbolos

	Contiene suficientes reactivos para <N> pruebas
	Fecha de caducidad
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	N.º de referencia
	Número de lote
	Número de material
	Componentes
	Contenido
	Número
	Limitación de temperatura
	Fabricante
	Consultar las instrucciones de uso

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visite nuestro Centro de servicio técnico en el sitio www.qiagen.com/Support, o bien póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos del servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Apéndice: detalles de mutación

Se utilizan los identificadores (ID) COSMIC del catálogo de mutaciones somáticas del cáncer (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabla 11. Lista de mutaciones e identificadores COSMIC

Mutación	Exón	Cambio de base	ID COSMIC
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Inserciones	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
		2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (complejo)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (complejo)	12384
		2236_2250del15	6225
Deleciones	19	2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (complejo)	12422
		2238_2252>GCA (complejo)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254

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

Tabla 11. Lista de mutaciones e identificadores COSMIC (continuación)

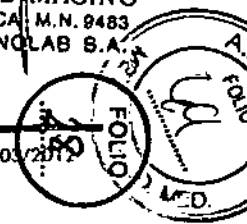
Mutación	Exón	Cambio de base	ID COSMIC
Deleciones	19	2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (complejo)	12382
		2239_2258>CA (complejo)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (complejo)	12383

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de referencia
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: 1 ensayo de control, 7 ensayos de mutaciones, control positivo, enzima Taq ADN polimerasa	870111
Rotor-Gene Q y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx Splex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de fusión de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) más un canal HRM, equipo portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002033
Rotor-Gene Q MDx Splex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de fusión de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) más un canal HRM, equipo portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9002032
Rotor-Gene Q Splex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de fusión de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) más un canal HRM, equipo portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9001650

1355

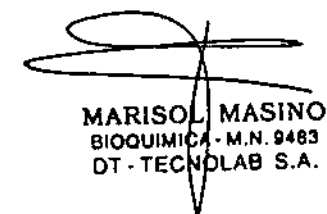
MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA M.N. 9483
DT-TECNOLAB S.A.



Producto	Contenido	N.º de referencia
Rotor-Gene Q Splex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de fusión de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) más un canal HRM, equipo portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9001580
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para la configuración de reacción manual con pipeta de un solo canal en tubos de 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapones para 1.000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapones para 10.000 reacciones	981106

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual del usuario o el manual del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.



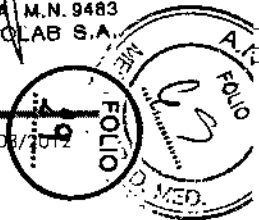
MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

1355

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



La compra de este producto permite al comprador utilizarlo en el rendimiento de servicios diagnósticos para diagnóstico humano *in vitro*. No se concede ninguna otra patente general o licencia de ningún tipo aparte de este derecho específico de uso mediante su compra.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, HRM®, Rotor-Gene®, Scorpions®, iTherascreen® (QIAGEN Group), ARMS® (AstraZeneca Limited), FAM™ y HEX™ (Life Technologies, Inc.)

El kit iTherascreen EGFR RQ2 PCR es un kit de diagnóstico con certificación CE, conforme a la directiva 98/79/CE para diagnóstico *in vitro*. No disponible en todos los países.

Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario de los kits iTherascreen EGFR RQ2 PCR la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit iTherascreen EGFR RQ2 PCR se utiliza exclusivamente de acuerdo con el Manual del kit iTherascreen EGFR RQ2 PCR y solo para uso con los componentes que se incluyen en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguno de sus derechos intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en el Manual del kit iTherascreen EGFR RQ2 PCR y en protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Estos kits y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costos judiciales, incluidos los honorarios de abogacía, por cualquier acción emprendida para garantizar el cumplimiento de este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual con relación a este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

© 2012 QIAGEN, reservadas todas las derechos.

www.qiagen.com

Australia • Orders 1-800-243-800 • Fax 03-9840-9888 • Technical 1-800-243-066

Austria • Orders 0800-28-10-10 • Fax 0800-28-10-19 • Technical 0800-28-10-11

Belgium • Orders 0800-79612 • Fax 0800-79611 • Technical 0800-79556

Brazil • Orders 0800-557779 • Fax 55-11-5079-4001 • Technical 0800-557779

Canada • Orders 800-572-9613 • Fax 800-713-5951 • Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China • Orders 86-21-3865-3865 • Fax 86-21-3865-3965 • Technical 800-988-0325

Denmark • Orders 80-885945 • Fax 80-885944 • Technical 80-885942

Finland • Orders 0800-914416 • Fax 0800-914415 • Technical 0800-914413

France • Orders 01-60-920-926 • Fax 01-60-920-925 • Technical 01-60-920-930 • Offers 01-60-920-928

Germany • Orders 02103-29-12000 • Fax 02103-29-22000 • Technical 02103-29-12400

Hong Kong • Orders 800 933 965 • Fax 800 930 439 • Technical 800 930 425

Ireland • Orders 1800 555 049 • Fax 1800 555 048 • Technical 1800 555 061

Italy • Orders 800-789-544 • Fax 02-334304-826 • Technical 800-787980

Japan • Telephone 03-6890-7300 • Fax 03-5547-0818 • Technical 03-6890-7300

Korea (South) • Orders 080-000-7146 • Fax 02-2626-5703 • Technical 080-000-7145

Luxembourg • Orders 8002-2076 • Fax 8002-2073 • Technical 8002-2067

Mexico • Orders 01-800-7742-639 • Fax 01-800-1122-330 • Technical 01-800-7742-436

The Netherlands • Orders 0800-0229592 • Fax 0800-0229593 • Technical 0800-0229600

Norway • Orders 800-18859 • Fax 800-18817 • Technical 800-18712

Singapore • Orders 1800-742-4362 • Fax 65-6854-8184 • Technical 1800-742-4368

Spain • Orders 91-630-7050 • Fax 91-630-5145 • Technical 91-630-7050

Sweden • Orders 020-790282 • Fax 020-790582 • Technical 020-798328

Switzerland • Orders 055-254-22-11 • Fax 055-254-22-13 • Technical 055-254-22-12

UK • Orders 01293-422-911 • Fax 01293-422-922 • Technical 01293-422-999

USA • Orders 800-426-8157 • Fax 800-718-2056 • Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNO LAB 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 1-47-8719/14-6

Se autoriza a la firma TECNOLAB S.A. a importar y comercializar el Producto para diagnóstico de uso in vitro denominado therascreen EGFR RGQ PCR / para la detección de 29 mutaciones somáticas en el gen EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el instrumento Rotor-Gene Q, a partir de muestras de ADN de tejido de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE). Envase conteniendo: Control de Reacción (Ctrl.: 2 X 600 µl), Mezcla de reacción para T790M (T790M: 600 µl), Mezcla de reacción para deleciones (Del: 600 µl), Mezcla de reacción para L858R (L858R: 600µl), Mezcla de reacción para L861Q (L861Q: 600 µl), Mezcla de reacción para G719X (G719X: 600 µl), Mezcla de reacción para S768I (S768I: 600 µl), Mezcla de reacción para inserciones (Ins: 600 µl), Control positivo de EGFR (PC: 300µl), Taq ADN polimerasa (Taq: 138 µl), Agua exenta de nucleasas (H₂O: 2 X 1,9ml), para 24 determinaciones. Vida útil: SEIS (6) MESES desde la fecha de elaboración, conservado entre -15°C y -25°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: Qiagen Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street North Manchester, M15 6SH (REINO UNIDO). 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 **008145**

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA
MEDICA

Buenos Aires, 05 FEB 2015


Ing ROGELIO LOPEZ
Administrador Nacional
A.N.M.A.T. Firma y sello

