



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

DISPOSICIÓN Nº 7057

BUENOS AIRES

30 JUN. 2016

VISTO, el expediente nº 1-47-3110-4128/15-1 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones la firma BIOARS S.A solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in Vitro" denominado GenoScreen KRAS-BRAF REAL TIME PCR KIT/ ENSAYO CUALITATIVO DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DE 8 MUTACIONES EN EL GEN KRAS, CODONES 12 Y 13, Y UNA MUTACIÓN EN EL GEN BRAF, CODÓN 600, UTILIZANDO UN ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL.

Que a fs. 123 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que el producto reúne 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 establecen la Ley 16.463, Resolución Ministerial Nº 145/98 y Disposición A N M A T Nº 2674/99.

Que se actúa en virtud de las facultades conferidas por el Decreto Nº 1490/92 y por el Decreto Nº 101 de fecha 16 de diciembre de 2015.

*Handwritten signature*



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

DISPOSICIÓN N°

7057

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACION NACIONAL DE  
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MÉDICA

D I S P O N E:

ARTICULO 1º.- Autorizase la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in Vitro" denominado GenoScreen KRAS-BRAF REAL TIME PCR KIT/ ENSAYO CUALITATIVO DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DE 8 MUTACIONES EN EL GEN KRAS, CODONES 12 Y 13, Y UNA MUTACIÓN EN EL GEN BRAF, CODÓN 600, UTILIZANDO UN ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL que será elaborado por DIAGCOR BIOSCIENCE INCORPORATION LIMITED. 28/F., Tower A, Billion Center, 1 Wang Kwong Road, Kowloon Bay, Hong Kong. (CHINA) e importado por BIOARS S.A a expenderse en ENVASES POR 24 DETERMINACIONES, CONTENIENDO: MEZCLA MAESTRA DE PCR KRAS-BRAF (1 vial x 1400 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12R (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12S (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12C (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12D (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12A (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12V (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G13C (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G13D (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES BRAF V600E (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES CONTROL KRAS-BRAF (1 vial x 160 µl) Y AGUA LIBRE DE DNasa (1 vial x 500 µl) ;cuya composición se detalla a fojas 25

A  
E  
N



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

DISPOSICIÓN Nº

7 0 5 7

con un período de vida útil de 12 (DOCE) meses desde la fecha de elaboración ,  
conservado entre 2 y 8°C.

ARTICULO 2º.- Acéptense los rótulos y manual de instrucciones obrantes a fojas  
36 a 116, desglosándose las fojas 38 a 40 y 45 a 68 debiendo constar en los  
mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en  
los rótulos de cada partida.

ARTICULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS,  
ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA, se reserva el derecho de reexaminar los  
métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo  
determinen.

ARTICULO 5º.- Regístrese; gírese a Dirección de Gestión de Información Técnica  
a sus efectos, por el Departamento de Mesa de Entradas 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 nº: 1-47-3110-4128/15-1.

DISPOSICIÓN Nº:

7 0 5 7

av.

  
Dr. ROBERTO LEIDE  
Subadministrador Nacional  
A. N. M. A. T.

7057  
30 JUN. 2016


TRIPPLICADO





# PROYECTO DE ROTULOS EXTERNOS

Nombre del producto:




GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit (Kit de PCR en tiempo real, GenoScreen KRAS/BRAF)


**GenoScreen KRAS/BRAF**  24 Tests  
**Real Time PCR Kit**


**REF** 92011  2°C - 8°C

**LOT** P1200102  YYYY-MM **IVD**

**GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit**


  

**EC REP** **EMERGO EUROPE**   
Molenstraat 15, 2513 BH  
The Hague The Netherlands

 **DiagCor Bioscience Inc. Ltd.** **IVD**  
28/F, Tower A, Billion Centre,  
Kowloon Bay, Hong Kong


**GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit**  
Components

- KRAS G12R Primer Mix
- KRAS G12C Primer Mix
- KRAS G12A Primer Mix
- KRAS G13C Primer Mix
- KRAS/BRAF Control Primer Mix
- KRAS/BRAF PCR Master Mix
- KRAS G12S Primer Mix
- KRAS G12D Primer Mix
- KRAS G12V Primer Mix
- KRAS G13D Primer Mix
- BRAF V600E Primer Mix
- DNase Free Water

 For short term storage/ transportation: keep at 2 to 8°C  
For long term storage: keep at 2 to 8°C

Establecimiento Elaborador DIAGCOR BIOSCIENCE INCORPORATION LIMITED – 28/F, Tower A, Billion Centre, 1 Wang Kwong Road, Kowloon Bay, Hong Kong, China.  
Establecimiento Importador BIOARS S.A. – Santo Domingo 2578/80 – Ciudad Autónoma de Buenos Aires  
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028  
Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. N° Certificado:

GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit. Producto DIAGCOR BIOSCIENCE INCORPORATION LIMITED

  
BIOARS S.A.  
BIOQ CLAUDIA ETCHEVES  
DIRECTOR TECNICO

ORIGINAL



7057

# PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS

Nombre del producto:

GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit (Kit de PCR en tiempo real) (GenoScreen KRAS/BRAF)	
<b>Mezcla Maestra de PCR KRAS/BRAF</b> GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit KRAS/BRAF PCR 1400 µL Master Mix LOT AE14012003 YYY-MM 2°C 8°C IVD	<b>Mezcla de cebadores KRAS G12R</b> GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit KRAS G12R Primer Mix 80 µL LOT BX08012003 YYY-MM 2°C 8°C IVD
<b>Mezcla de cebadores KRAS G12S</b> GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit KRAS G12S Primer Mix 80 µL LOT BY08012003 YYY-MM 2°C 8°C IVD	<b>Mezcla de cebadores KRAS G12C</b> GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit KRAS G12C Primer Mix 80 µL LOT BZ08012003 YYY-MM 2°C 8°C IVD
<b>Mezcla de cebadores KRAS G12D</b> GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit KRAS G12D Primer Mix 80 µL LOT CA08012003 YYY-MM 2°C 8°C IVD	<b>Mezcla de cebadores KRAS G12A</b> GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit KRAS G12A Primer Mix 80 µL LOT CB08012003 YYY-MM 2°C 8°C IVD
<b>Mezcla de cebadores KRAS G12V</b> GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit KRAS G12V Primer Mix 80 µL LOT CC08012003 YYY-MM 2°C 8°C IVD	<b>Mezcla de cebadores KRAS G13C</b> GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit KRAS G13C Primer Mix 80 µL LOT CD08012003 YYY-MM 2°C 8°C IVD

GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit; Productos DIAGCOR BIOSCIENCE INCORPORATION LIMITED

*[Handwritten Signature]*  
 DIRECTOR TÉCNICO



<b>Mezcla de cebadores KRAS G13D</b>  GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit <b>KRAS G13D Primer Mix 80 µL</b>  [LOT] CE08012003  8°C YYYY-MM ZC	<b>Mezcla de cebadores BRAF V600E</b>  GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit <b>BRAF V600E Primer Mix 80 µL</b>  [LOT] CG08012003  8°C YYYY-MM ZC
<b>Mezcla de cebadores control KRAS/BRAF</b>  GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit <b>KRAS/BRAF Control 160 µL Primer Mix</b>  [LOT] CF16012003  8°C YYYY-MM ZC	<b>Agua libre de DNasa</b>  GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit <b>DNase Free Water 500 µL</b>  [LOT] A50012003  8°C YYYY-MM ZC

Establecimiento Elaborador DIAGCOR BIOSCIENCE INCORPORATION LIMITED – 28/F, Tower A, Billion Centre, 1 Wang Kwong Road, Kowloon Bay, Hong Kong, China.  
Establecimiento Importador BIOARS S.A. – Santo Domingo 2578/80 – Ciudad Autónoma de Buenos Aires  
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028  
Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. N° Certificado:

E

GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit; Productos DIAGCOR BIOSCIENCE INCORPORATION LIMITED

*Claudia E. Etchevés*  
BIOARS S.A.  
BIOQ CLAUDIA ETCHEVES  
DIRECTOR TECNICO

**ORIGINAL**

EDICIÓN SEPTIEMBRE 2014

7057



# GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR Kit

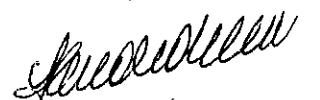
Kit de PCR en tiempo real GenoScreen KRAS/BRAF

**INSTRUCCIONES DE USO**

**CE** IVD

REF **92011**

 **24 Pruebas**

  
BIOGEN S.A.  
BIOGEN CLAUDIA ETOCHEYES  
DIRECTOR TECNICO



7057

# Tabla de Contenido

- I. Introducción y antecedentes..... 3
  - A. Uso previsto ..... 3
  - B. Información general de la prueba KRAS/BRAF ..... 3
  - C. Principio del procedimiento..... 4
  - D. Contenido del kit y condiciones de almacenamiento ..... 6
  - E. Materiales adicionales requeridos..... 8
  - F. Notas importantes ..... 9
  - G. Precauciones generales ..... 10
- II. Procedimiento de la prueba ..... 11
  - A. Obtención, transporte y almacenamiento de muestras ..... 11
  - B. Preparación del ADN ..... 11
  - C. Amplificación del ADN objetivo..... 12
  - D. Análisis de datos e interpretación con  
ABI 7500, ABI 7900 o ABI ViiA7 ..... 15
- III. Solución de problemas ..... 18
- IV. Características de Rendimiento..... 19
  - A. Sensibilidad Analítica (Límite de detección)..... 19
  - B. Especificidad Analítica ..... 19
  - C. Reproducibilidad..... 21
  - D. Rendimiento clínico ..... 21
- V. Bibliografía..... 22
- VI. ANEXOS ..... 23
  - A. Índice de símbolos ..... 23
  - B. Servicio de asistencia técnica..... 24

5

*[Handwritten signature]*  
BIOQUÍMICO  
DIRECTOR TÉCNICO





# I. Introducción y antecedentes

## A. Uso previsto

El Kit GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR es un ensayo cualitativo provisto para la detección de 8 mutaciones de KRAS, en el codón 12 y 13, y una mutación de BRAF en el codón 600 utilizando un ensayo de PCR en tiempo real. Este producto está provisto para el uso en diagnóstico *in vitro*. Funciona como una herramienta de diagnóstico para la predicción de la respuesta al tratamiento con terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en pacientes con cáncer.

7057

## B. Información general de la prueba KRAS/BRAF

Mutaciones en KRAS/BRAF han sido implicadas en varios tipos de tumores que van desde el cáncer colorectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas y melanoma. La presencia de mutaciones KRAS/BRAF han sido relacionadas a la resistencia de drogas con inhibidores de tirosina quinasa, que poseen como blanco la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en terapias contra el cáncer. Este producto es diseñado para identificar 8 mutaciones de KRAS y una mutación de BRAF como se muestra en la Tabla 1A y 1B.

E

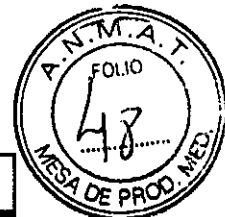


Tabla 1A: Mutaciones de KRAS en los codones 12 y 13

Mutación	Sustitución de Base	Cosmic ID*
G12R	<u>G</u> GT > <u>C</u> GT	518
G12S	<u>G</u> GT > <u>A</u> GT	517
G12C	<u>G</u> GT > <u>I</u> GT	516
G12D	<u>G</u> GT > <u>G</u> AT	521
G12A	<u>G</u> GT > <u>G</u> CT	522
G12V	<u>G</u> GT > <u>G</u> IT	520
G13D	<u>G</u> GC > <u>G</u> AC	532
G13C	<u>G</u> GC > <u>I</u> GC	527

7057

Tabla 1B: Mutación de BRAF en el codón 600

Mutación	Sustitución de Base	Cosmic ID*
V600E	<u>G</u> TG > <u>G</u> AG	476

\*Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer

La prueba puede ser completada en menos de 4 horas y provee un método altamente sensible para detectar mutantes tan bajos como 0,1% entre ADN del tipo salvaje.

### C. Principio del procedimiento

El Kit GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR está basado en la amplificación por PCR de ADN mutante con cebadores específicos, detectado mediante la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La detección de los productos blanco amplificados (amplicones) es obtenida por el clivado de sondas de oligonucléotidos marcados con fluorescencia dual durante la cuantificación de ADN mutante.

E



El kit contiene todos los reactivos de PCR necesarios para una rápida, sensible y reproducible detección en tiempo real de mutaciones de KRAS y BRAF en muestra de ADN. La **Mezcla Maestra de PCR KRAS/BRAF** lista para usar, acoplada con la **Mezcla de Cebadores** específicos, permite la amplificación de mutantes ADN de KRAS o mutantes ADN de BRAF individuales, como lo indicado por la señal FAM. Un **Ensayo Control** utilizando la mezcla de cebadores control KRAS/BRAF se encuentra incluido para monitorear la interferencia en la amplificación o inhibidores de PCR de muestras humanas.

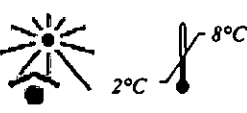
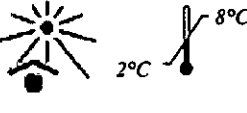
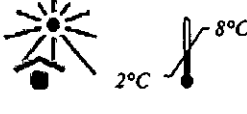
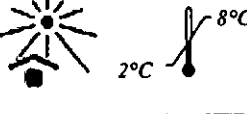
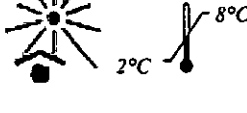
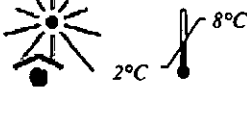
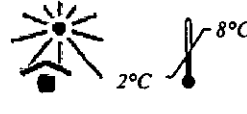
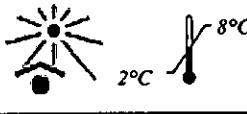
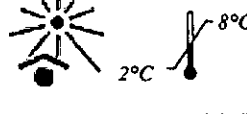
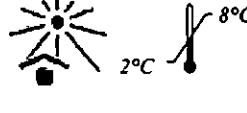
7057

E



## D. Contenido del kit y condiciones de almacenamiento

El Kit GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR permite realizar hasta 24 reacciones

Componentes	Total	Cantidad
<b>Mezcla Maestra de PCR KRAS/BRAF</b> ADN Taq Polimerasa dATP, dUTP, dCTP, dGTP ROX™ buffers de componentes de referencia pasiva 	1400 µl	1 vial <b>7057</b>
<b>Mezcla de cebadores KRAS G12R</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes 	80 µl	1 vial
<b>Mezcla de cebadores KRAS G12S</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes 	80 µl	1 vial
<b>Mezcla de cebadores KRAS G12C</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes 	80 µl	1 vial
<b>Mezcla de cebadores KRAS G12D</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes 	80 µl	1 vial
<b>Mezcla de cebadores KRAS G12A</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes 	80 µl	1 vial
<b>Mezcla de cebadores KRAS G12V</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes 	80 µl	1 vial
<b>Mezcla de cebadores KRAS G13C</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes 	80 µl	1 vial
<b>Mezcla de cebadores KRAS G13D</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes 	80 µl	1 vial
<b>Mezcla de cebadores BRAF V600E</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes 	80 µl	1 vial



<b>Mezcla de cebadores control KRAS/BRAF</b> Cebadores Sondas teñidas con marcador fluorescentes		160 µl	1 vial
<b>Agua libre de DNasa</b> <b>CONTROL -</b>		500 µl	1 vial

7057

\* PCR (siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa) y sus métodos están protegidos por las patentes y aplicaciones de patentes propiedad de F. Hoffmann – La Roche AG. No se traslada ninguna autorización, licencia implícita o licencia explícita de práctica con PCR o cualquier otro método que utilice PCR por la compra de este producto.

En las condiciones de almacenamiento adecuadas, indicadas a continuación, los reactivos son estables hasta su fecha de caducidad.

**Para almacenamiento corto/transporte:** Mantener entre 2 y 8°C.

Se recomienda almacenar los reactivos por separado de cualquier posible fuente de contaminación.

E



## E. Materiales adicionales requeridos

Paso	Materiales
Preparación del ADN	<ul style="list-style-type: none"><li>• Solución Buffer fosfato salino 1x</li><li>• Tubos estériles libres de DNasa</li><li>• Pipetas (de volumen ajustable)</li><li>• Puntas con barrera de aerosol</li><li>• Microcentrífuga de alta velocidad</li><li>• Bloque de calor (para la digestión de la proteasa)</li><li>• Reactivos para aislamiento de ADN</li></ul> <p style="text-align: right; font-size: 2em; font-weight: bold;">7057</p>
Amplificación del ADN objetivo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tubos estériles libres de DNasa</li><li>• Pipetas (de volumen ajustable)</li><li>• Puntas con barrera de aerosol</li><li>• Termociclador para Tiempo real (ABI 7500 o ABI 7900, o ABI ViiA7 o sistemas en tiempos real comparables)</li><li>• Microcentrífuga de alta velocidad</li></ul>
Interpretación de los datos	<ul style="list-style-type: none"><li>• No requiere material adicional</li></ul>

E



## F. Notas importantes

- EL kit está provisto para la predicción de la respuesta al tratamiento únicamente y no debe ser usado para el diagnóstico de ningún tipo de cáncer. **7057**
- Las decisiones en el tratamiento de pacientes con cáncer no deben ser tomadas en base al estado de la mutación KRAS/BRAF solamente; factores clínicos específicos adicionales en pacientes individuales también deben ser tenidos en cuenta.
- Los pacientes que resultaron negativos (genotipo salvaje) en este ensayo podrían contener mutaciones en otros codones de KRAS (ejemplo, 61, 146)
- Un resultado falso negativo podría ser debido a ADN fragmentado por el proceso de fijación de la muestra.
- Este producto provee sólo resultados cualitativos. No hay asociación entre la magnitud de las mutaciones detectadas y la cantidad de células mutadas dentro del espécimen.
- El ensayo de control positivo no eliminarán todos resultados falsos negativos y los de prueba inválida ya que este podría permitir solo la identificación de inhibidores de la PCR de la mayoría de las muestras.
- Este producto debe usarse sólo por personal de laboratorio entrenado.
- Se requiere el cumplimiento estricto del procedimiento para obtener resultados óptimos.
- Lea atentamente las instrucciones antes de llevar a cabo la prueba.

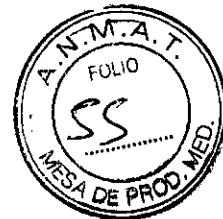


## G. Precauciones generales

- Los especímenes deben tratarse siempre como potencialmente infecciosos y manejarse de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio.
- Para asegurar una óptima actividad del kit, los oligonucleótidos marcados con fluorescencia deben estar protegidos de la luz para evitar la pérdida de la fluorescencia.
- Para evitar posibles contaminantes en la reacción de PCR, se recomienda el uso de pipetas separadas y dedicadas para la preparación de la reacción de PCR y para agregar el molde de ADN. La preparación y dispensado en la reacción de PCR debe ser realizado en áreas separadas al agregado de la muestra de ADN.
- Es recomendable descontaminar el banco de trabajo y todas las pipetas antes de la prueba con etanol al 70%.
- Utilice guantes desechables, ropa de laboratorio y protección en los ojos cuando maneje reactivos o especímenes. Lávese las manos cuidadosamente tras realizar la prueba.
- Mantenga todos los componentes en hielo mientras realiza la reacción de PCR.
- Los reactivos sin usar y desechos generados por la utilización de este producto no son peligrosos y deben eliminarse de acuerdo con todas las normativas locales, regionales y nacionales aplicables sobre medioambiente y salud.
- No utilice el producto si están dañados los empaques externos o los recipientes de los reactivos.

7057





## II. Procedimiento de la prueba

### A. Obtención, transporte y almacenamiento de muestras

Este producto puede ser usado para analizar el ADN extraído de los siguientes tipos de especímenes:

- Tejido fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE: Formalin-fixed Paraffin-embedded)

7057

**Nota:** Todos los especímenes deben ser tratados como material potencialmente infeccioso. Los especímenes deben ser transportados en las condiciones indicadas, siguiendo las instrucciones locales y nacionales para el transporte de material patogénico.

### B. Preparación del ADN

Los kits de extracción de ADN disponibles son de varios fabricantes. Realizar la extracción de ADN como lo indican las instrucciones del manual del fabricante. La cantidad de muestra de ADN extraído puede medirse usando un espectrofotómetro. El ADN extraído debe ser almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes del análisis.

#### Kits de extracción recomendado disponible comercialmente:

- QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit es recomendado para tejidos incrustados en parafina.

**Nota:** QIAamp<sup>®</sup> es un nombre comercial registrado de QIAGEN.



## C. Amplificación del ADN objetivo

### Utilización del control científico

El control científico se ha diseñado para supervisar el desempeño de la prueba. Es necesario el procesamiento de un control positivo y un control negativo por cada vez que se ejecutan las muestras.

7057

- **Ensayo del Control positivo**

Cuando es probada una muestra de ADN, se debe aplicar una Mezcla de Cebadores Control KRAS/BRAF el cual es usado para evaluar la calidad de la muestra. El ensayo por debajo del valor de Ct aceptado (**Tabla 4**) indica una sobrecarga del ensayo y es recomendado diluir el ADN. Si el ensayo está por encima del valor de Ct aceptado, se requiere ADN más concentrado.

**Nota:** El ensayo de control positivo no supervisará la eficiencia de amplificación o el nivel de detección de la prueba.

- **Ensayo del Control negativo**

El agua libre de DNasa (sin ADN molde) es un control negativo que genera un resultado negativo (no hay detección de señal) con la Mezcla de Cebadores KRAS/BRAF. Se utiliza para identificar cualquier contaminación, tanto ambiental como de las personas que realizan el prueba. El valor Ct de la señal del control negativo debe ser mayor que la Ct recomendada (**Tabla 4**). Cualquier resultado no válido del control negativo invalida el procesamiento.

C



## Procedimientos

1. Tome el volumen correspondiente, mezcle y centrifugue todos los reactivos de PCR antes de usar.

Nota: Mezcle los reactivos de PCR suavemente y evitar mezclar con el vortex vigorosamente a los reactivos.

7057

2. Prepare la reacción de PCR (volumen final 10  $\mu$ l) de acuerdo con la Tabla 2:

Tabla 2. Volúmenes recomendados de los componentes de la reacción para amplificar el ADN

Componente	Volumen ( $\mu$ l)
Mezcla Maestra de PCR KRAS/BRAF	5
Mezcla de Cebadores	3
Muestra de ADN (ADN/H <sub>2</sub> O)	2
Total	10

Nota: El rango sugerido de ADN total es de 5 – 20 ng.

3. Reparta 8  $\mu$ l de la mezcla de PCR (contiendo la Mezcla Maestra de PCR KRAS/BRAF y la Mezcla de Cebadores) en cada tubo de PCR y añada la cantidad adecuada de la muestra de ADN sugerida. Si es necesario añada agua libre de DNasa hasta conseguir un volumen de reacción de 10  $\mu$ l.

4. Agite y centrifugue la mezcla de reacción de PCR. Coloque los tubos de PCR en el termociclador de PCR en tiempo real y ejecute el perfil térmico. (Protocolo para ABI 7500/ABI 7900/ ABI ViiA7 como lo indica a continuación).

E



Amplificación en tiempo real y detección con ABI 7500/ABI 7900 o ABI ViiA7

5. En el "setup", elegir Reactivos Taq Man, seleccionar "FAM" como reportero y "NFQ-MGB" para Quencher.

7057

6. Elegir "ROX" para referencia pasiva.

7. Configurar el "Run Method" de acuerdo a la Tabla 3 como mostrado a continuación.

Tabla 3. Perfil de amplificación del Kit GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR

Paso	Objetivo (°C)	Tiempo (min/seg)	Ciclo	Modo de adquisición
Desnaturalización	95	10 min.	1	Ninguno
Amplificación	95	15 seg.	50	Ninguno
	60	1 min.		Canal FAM

Nota: Ingresar "10 µl" como volumen de reacción por pocillo y proceder con el inicio de la prueba.

E.



#### D. Análisis de datos e interpretación con ABI 7500, ABI 7900 o ABI ViiA7

7057

1. Cuando se completa la prueba, los datos pueden ser analizados luego de configurar el umbral para la señal de FAM.

2. El valor del ciclo umbral (Ct) debe ser establecido en 1/20 de cada punto de fluorescencia más alto del marcador individual para el progreso de la prueba (FAM).

3. Controlar la señal de FAM del ensayo positivo y negativo para determinar la validación del desarrollo de la prueba en tiempo real.

a. El ensayo positivo debe dar un valor de Ct entre 24 y 38, el dato es inválido si este no se encuentra dentro del rango. Si el dato es inválido, repetir el desarrollo en tiempo real con las siguientes instrucciones:

Si el ensayo es positivo  $Ct < 24$ : se debe realizar una dilución;

Si el ensayo es positivo  $Ct > 38$ : se debe concentrar la muestra de ADN.

b. El ensayo de control negativo debe tener un valor de Ct mayor de 45.

Podría haberse contaminado la muestra durante la preparación de la reacción de PCR en tiempo real si es menor a 45. Se sugiere repetir los experimentos.

4. El valor de corte para cada ensayo de mutación y ensayo control se muestra en la **Tabla 4.**

**7057**

Tabla 4. Determinación de resultados utilizando ABI7500, ABI 7900 y ABI ViiA7

Ensayo de Mutación	Valor de Ct
KRAS G12R	< 35
KRAS G12S	< 33
KRAS G12C	< 34
KRAS G12D	<36
KRAS G12A	< 34
KRAS G12V	< 32
KRAS G13C	< 36
KRAS G13D	< 36
BRAF V600E	< 35
Control Positivo	24 - 38
Control Negativo	> 45

**Nota:** El valor de Ct es válido sólo si la amplificación muestra un gráfico de forma sigmoidea.

*E*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*



7057

**ESTA PÁGINA SE HA DEJADO EN BLANCO A  
PROPÓSITO.**

E.

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

### III. Solución de problemas



7057

Observación	Enfoque
<p>No hay señal (Valor de Ct mayor que el corte) en el control positivo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Presencia de inhibidores en el ADN si no hay señal del control positivo. Se recomienda diluir la muestra de ADN salvo que la cantidad de ADN inicial fuera menor a 5 ng luego de la dilución, en tal caso se recomienda extraer ADN nuevamente.</li> <li>■ No se cumplieron las condiciones de almacenamiento para los componentes del kit según las instrucciones dadas.</li> <li>■ Las condiciones para el desarrollo de la PCR no cumplieron con el protocolo. Revisar el protocolo de amplificación y seleccionar el canal de fluorescencia como es indicado en el manual de instrucciones.</li> <li>■ EL Kit GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR ha caducado</li> </ul>
<p>Señal positiva detectada en un control negativo</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ La reacción de PCR pudo haberse contaminado durante la preparación. Descontamine todas las superficies e instrumentos. Repita la PCR en tiempo real con nuevas alícuotas de reactivos en réplicas.</li> </ul>
<p>Más de una mutación en un codón</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Se requiere diluir la muestra si se encuentran más de una mutación en un codón. Se recomienda diluir entre 5 y 10 veces a la muestra.</li> </ul>

E

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*





## IV. Características de Rendimiento

7057

### A. Sensibilidad Analítica (Límite de detección)

La sensibilidad analítica del producto se determina diluyendo clones de plásmidos mutantes a  $10^3$  copias y detectándolos en presencia de  $10^6$  copias de un clon plasmídico salvaje. La relación de la concentración de mutante respecto al salvaje es 1:1000, lo cual significa que el límite de detección de cada mutación es 0,1%

### B. Especificidad Analítica

Para demostrar especificidad, se evaluó el valor de Ct de las muestras clínicas con un genotipo de mutación conocida. El valor de Ct de 18 muestras clínicas (2 muestras por cada tipo de mutación) fueron analizadas y la mutación correcta fue determinada de acuerdo al valor de corte de Ct de la mutación establecida.

E

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*



Tabla 5. Especificidad de cada uno de los ensayos de mutantes en el Kit GenoScreen KRAS/BRAF Real Time

Muestra	Estado clínico	G12R <35	G12S <33	G12C <34	G12D <36	G12A <34	G12V <32	G13C <36	G13D 736	BRAF V600E 5357
11S6129	G12R	31,3	38,9	43,6	42,6	41,3	43,2	41,4	42,5	42,3
12S3432	G12R	29,7	36,5	40,1	41,3	47,5	46,8	42,5	43,8	37,6
120308001	G12S	38,6	31,6	45,4	45,4	UD	43,5	40,3	46,2	37,9
943-95	G12S	38,1	26,9	42,2	37,6	37,6	34,6	44,8	37,0	36,5
101115001	G12C	39,8	41,3	33,1	UD	UD	43,9	44,2	UD	42,2
120502001	G12C	38,3	40,2	32,0	UD	44,6	38,6	46,4	48,3	37,8
111021001	G12D	UD	42,8	UD	32,2	UD	40,1	UD	UD	39,4
111101001	G12D	UD	40,5	UD	32,4	UD	UD	49,1	46,2	39,8
120425002	G12A	UD	37,5	UD	UD	30,7	36,7	UD	UD	37,3
120820009	G12A	UD	38,4	UD	UD	31,4	36,7	46,2	48,4	37,9
110323004	G12V	UD	37,9	47,8	UD	42,1	31,0	UD	UD	39,5
110331001	G12V	UD	38,0	UD	UD	40,0	30,7	46,6	43,6	39,7
1206-2	G13C	UD	34,4	41,5	39,9	36,8	36,1	29,4	43,5	37,8
26531	G13C	39,5	37,8	46,4	40,4	41,8	40,5	32,0	UD	39,8
110224001	G13D	42,1	39,1	UD	UD	UD	43,7	UD	31,8	40,1
110304002	G13D	UD	41,4	UD	UD	UD	UD	UD	34,9	41,2
100420009	BRAF V600E	41,1	38,7	49,3	UD	42,8	43,3	49,1	UD	32,8
100420011	BRAF V600E	UD	37,4	47,5	44,0	UD	40,5	48,0	UD	31,9

E

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*

### C. Reproducibilidad

El Kit GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR fue evaluado para determinar reproducibilidad en 3 experimentos independientes mediante el análisis de resultados día a día y operado a operador. La reproducibilidad del producto fue estimado realizando el ensayo con un plásmido mutante clonado KRAS/BRAF en  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^6$  copias en presencia de  $10^6$  plásmido salvaje KRAS por reacción. Los resultados de todas las pruebas realizadas concordaron entre sí para todas las concentraciones, demostrando buena reproducibilidad de resultados cualitativos con esta prueba.

7057

### D. Rendimiento clínico

El rendimiento clínico del Kit GenoScreen KRAS/BRAF Real Time PCR fue evaluado con resultados de secuenciación Sanger como referencia (gold standard). Los datos generados, son analizados en una tabla de contingencia 2x2 y se obtuvieron los siguientes parámetros diagnósticos:

		Secuenciación Sanger (Gold Standard)			
		N=73	Positivo	Negativo	
Kit GenoScreen KRAS/BRAF Real	Positivo		Verdadero positivo = 44	Falso positivo = 1	Valor predictivo positivo = 97,78%
	Negativo		Falso negativo = 0	Verdadero negativo = 29	Valor predictivo negativo = 100,00%
			Sensibilidad = 100%	Especificidad = 98,5%	
			Relación falso negativo = 0,00%	Relación falso positivo = 3,33%	



## V. Bibliografía

1. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM (2011) BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. Mol Cancer Ther 10:385–94.
2. Levy M and Pao W. My cancer genome – Genetically Informed Cancer Medicine (2011) Vanderbilt-Ingram Cancer Center at Vanderbilt University Medical Center
3. Linardou H et al. (2011) All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. Cancer Treat Rev 37:221–33.
4. Wang HL, Lopategui J, Amin MB, Patterson SD (2010) KRAS mutation testing in human cancers: The pathologist's role in the era of personalized medicine. Adv Anat Pathol 17:23–32.

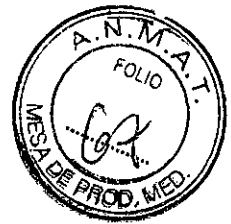
7057

E

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*

# VI. ANEXOS



## A. Índice de símbolos

	REPRESENTANTE AUTORIZADO EN LA COMUNIDAD EUROPEA
	CÓDIGO DE LOTE
	NÚMERO DE CATÁLOGO
	CONSULTE LAS INSTRUCCIONES DE USO
	PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO
	MANTENER ALEJADO DE LA LUZ SOLAR
	MANTENER SECO
	FABRICANTE
	CONTROL POSITIVO
	CONTROL NEGATIVO
	SUFICIENTE PARA
	LIMITACIÓN DE TEMPERATURA
	UTILIZAR ANTES DE

7057

El sistema de etiquetado utilizado es conforme a las normas BS EN ISO15223-1:2012.

Versión del manual: DC/PD/E17 versión 4.0  
 Última revisión: Septiembre de 2014

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*



## B. Servicio de asistencia técnica

Para más información sobre los productos de DiagCor visite nuestro sitio web:  
[www.diagcor.com](http://www.diagcor.com) o póngase en contacto con nosotros por correo electrónico:  
[info@diagcor.com](mailto:info@diagcor.com)

7057

Si requiere asistencia técnica póngase en contacto con su distribuidor u oficina local de DiagCor.



**EMERGO EUROPE**  
Molenstraat 15  
2513 BH The Hague  
The Netherlands



**DiagCor Bioscience Inc. Ltd**  
28/F, Tower A, Billion Centre,  
1 Wang Kwong Road,  
Kowloon Bay, Hong Kong



### INDICACIÓN AL CONSUMIDOR

1. Por cualquier información puede consultar al siguiente teléfono: (011) 4555-4601 en el horario de 9.00 a 18.00 de Lunes a Viernes. Personal de BIOARS S.A. estará a vuestra disposición.
2. La mercadería viaja por cuenta y riesgo del destinatario. Todo reclamo será atendido según lo prevee el "Manual de procedimiento para reclamos técnicos y devolución de mercadería" que BIOARS S. A. pone a disposición del Cliente.

Establecimiento Elaborador: DIAGCOR BIOSCIENCE INCORPORATION LIMITED – 28/F, Tower A, Billion Centre, 1 Wang Kwong Road, Kowloon Bay, Hong Kong, China.  
Establecimiento Importador BIOARS S.A. – Santo Domingo 2578/80 – Ciudad Autónoma de Buenos Aires.  
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028  
Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. N° Certificado:



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

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

Expediente nº:1-47-3110-4128/15-1


Se autoriza a la firma BIOARS S.A a importar y comercializar el Producto para Diagnóstico de uso "in vitro" denominado GenoScreen KRAS-BRAF REAL TIME PCR KIT/ ENSAYO CUALITATIVO DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DE 8 MUTACIONES EN EL GEN KRAS, CODONES 12 Y 13, Y UNA MUTACIÓN EN EL GEN BRAF, CODÓN 600, UTILIZANDO UN ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL, en ENVASES POR 24 DETERMINACIONES, CONTENIENDO: MEZCLA MAESTRA DE PCR KRAS-BRAF (1 vial x 1400 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12R (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12S (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12C (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12D (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12A (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G12V (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G13C (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES KRAS G13D (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES BRAF V600E (1 vial x 80 µl), MEZCLA DE CEBADORES CONTROL KRAS-BRAF (1 vial x 160 µl) Y AGUA LIBRE DE DNasa (1 vial x 500 µl). Se le asigna la categoría: Venta a laboratorios de Análisis clínicos por hallarse comprendido en las condiciones establecidas en la Ley 16.463, y Resolución M.S. y A.S. N° 145/98. Lugar de elaboración: DIAGCOR BIOSCIENCE INCORPORATION LIMITED. 28/F., Tower A, Billion Center, 1 Wang Kwong Road, Kowloon Bay, Hong Kong. (CHINA). Periodo de vida útil: 12 (DOCE) meses,

*[Handwritten signature]*

desde la fecha de elaboración, conservado entre 2 y 8 °C. En las etiquetas de los envases, anuncios y Manual de instrucciones deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO DE USO "IN VITRO" USO PROFESIONAL EXCLUSIVO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA.

Certificado n°: **008443**

ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA.

 Buenos Aires,

**30 JUN. 2016**

  
Dr. ROBERTO LEDESMA  
Administrador Nacional  
Firma y sello.