



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

DISPOSICIÓN Nº 7 0 6 5

BUENOS AIRES, 30 JUN 2016

VISTO el expediente Nº 1-47-3110-1177/16-1 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 1) *therascreen* EGFR RGQ PCR kit versión 2 (V2) / ENSAYO DISEÑADO 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 JUNTO AL SOFTWARE *therascreen* EGFR CE Assay Package, A PARTIR DE MUESTRAS DE ADN OBTENIDAS DE TEJIDO DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO (NSCLC) FIJADO EN FORMALINA E INCLUIDO EN PARAFINA (FFPE); 2) *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR/ ENSAYO DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DE DELECCIONES DEL EXÓN 19 Y SUSTITUCIONES EN LOS EXONES 20 Y 21 EN EL GEN EGFR, COMO AYUDA EN LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO (NSCLC), CUANDO NO ES POSIBLE REALIZAR LA EVALUACIÓN CON UNA MUESTRA DE TEJIDO, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN EL INSTRUMENTO Rotor-Gene Q.

Handwritten signature



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

DISPOSICIÓN Nº 7065

Que a fojas 356 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que 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 Nº 16.463, Resolución Ministerial Nº 145/98 y Disposición ANMAT Nº 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos Nº 1490/92 el por el Decreto Nº 101 de fecha 16 de diciembre de 2015.

Por ello;

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

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos del productos de diagnostico para uso in Vitro denominado 1) *therascreen* EGFR RGQ PCR kit versión 2 (V2) / ENSAYO DISEÑADO 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 JUNTO AL SOFTWARE *therascreen* EGRF CE Assay Package, A PARTIR DE MUESTRAS DE ADN OBTENIDAS DE TEJIDO DE CANCER DE PULMÓN NO MICRICÍTICO (NSCLC) FIJADO EN FORMALINA E

[Handwritten signature]



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

DISPOSICIÓN N° 7065

INCLUIDO EN PARAFINA (FFPE); 2) *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR/ ENSAYO DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DE DELECCIONES DEL EXÓN 19 Y SUSTITUCIONES EN LOS EXONES 20 Y 21 EN EL GEN EGFR, COMO AYUDA EN LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON CANCER DE PULMÓN NO MIGRICÍTICO (NSCLC), CUANDO NO ES POSIBLE REALIZAR LA EVALUACIÓN CON UNA MUESTRA DE TEJIDO, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN EL INSTRUMENTO Rotor-Gene Q en envases que se detallan en el Anexo, con una vida útil de 1) SEIS (6) meses desde la fecha de elaboración conservado entre -15 y -30 °C; 2) DOCE (12) meses desde la fecha de elaboración conservado entre -15 y -30 °C; el que será elaborado por 1) y 2) QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, (ALEMANIA) para QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street North, Manchester, M15 6SH (REINO UNIDO) e importado terminado por la firma TECNOLAB S.A. y que la composición se detalla a fojas 118 a 311.

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 97 a 177 y 310 a 354 desglosándose las fojas 151 a 177 y 340 a 354 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

[Handwritten signature]
[Handwritten initials]



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

DISPOSICIÓN Nº **7 0 6 5**

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 Nº 1-47-3110-1177/16-1

DISPOSICIÓN Nº:

E
p

Fd

7 0 6 5

[Handwritten signature]
Dr. ROBERTO LEDER
Subadministrador Nacional
A.N.M.A.T.



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

ANEXO

Expediente Nº 1-47-3110-1177/16-1

PRODUCTO/USO: 1) *therascreen* EGFR RGQ PCR kit versión 2 (V2) / ENSAYO DISEÑADO 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 JUNTO AL SOFTWARE *therascreen* EGRF CE Assay Package, A PARTIR DE MUESTRAS DE ADN OBTENIDAS DE TEJIDO DE CANCER DE PULMÓN NO MICRICÍTICO (NSCLC) FIJADO EN FORMALINA E INCLUIDO EN PARAFINA (FFPE); 2) *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR/ ENSAYO DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DE DELECCIONES DEL EXÓN 19 Y SUSTITUCIONES EN LOS EXONES 20 Y 21 EN EL GEN EGFR, COMO AYUDA EN LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON CANCER DE PULMÓN NO MICRICÍTICO (NSCLC), CUANDO NO ES POSIBLE REALIZAR LA EVALUACIÓN CON UNA MUESTRA DE TEJIDO, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN EL INSTRUMENTO Rotor-Gene Q.

PRESENTACIÓN: 1) y 2) ENVASES POR 24 DETERMINACIONES, CONTENIENDO

	1) <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR kit versión 2	2) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR
Control Reaction Mix	2 viales x 600 µl	2 viales x 600 µl
T790M Reaction Mix	600 µl	600 µl

Handwritten signature



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

Deletions Reaction mix	600 µl	600 µl	
L858R Reaction Mix	600 µl	600 µl	
L861Q Reaction Mix	600 µl	--	
G719X Reaction Mix	600 µl	--	
S768I Reaction Mix	600 µl	--	
Insertions Reaction Mix	600 µl	--	
EGFR Positive Control	300 µl	300 µl	
Taq DNA Polymerase	2 viales x 80 µl	2 viales x 80 µl	
Agua exenta de nucleasas para el control sin molde	1, 9 ml	1, 9 ml	
Agua exenta de nucleasas para la dilución	1, 9 ml	1, 9 ml	

DISPOSICION Nº:

7 0 6 5

fd

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

Junio de 2015

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.

Manual de uso del kit *therascreen*® EGFR RGQ PCR



24

Versión 2

IVD

Para uso de diagnóstico in vitro

Para uso con equipos Rotor-Gene® Q MDx

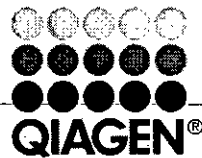


REF 874111



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

R2 MAT 1090641ES

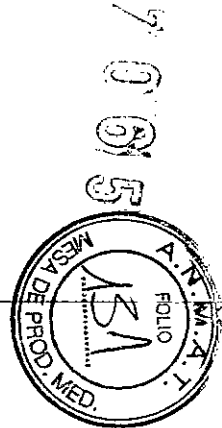


MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.



tecnolab s.a.
estomba 964 . c1427cov
capital federal . argentina
tel. 54 11 4555 0010
54 11 4859 5300
fax 54 11 4553 3331
info@tecnolab.com.ar
www.tecnolab.com.ar
ISO 9001:2008 certificada

30 JUN 2016



Sample & Assay Technologies

Contenido			
Uso previsto	5	Reproducibilidad	56
Resumen y explicación	5	Rendimiento clínico	59
Principio del procedimiento	7	Datos de resultados clínicos	59
Materiales suministrados	11	Referencias	61
Contenido del kit	11	Símbolos	63
Materiales requeridos pero no suministrados	12	Apéndice A: protocolo manual del kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR	64
Advertencias y precauciones	13	Información general	64
Información de seguridad	13	Protocolo:	
Precauciones generales	13	■ Creación de un perfil de temperatura	64
Almacenamiento y manipulación de reactivos	15	Procedimiento (manual)	73
Manipulación y almacenamiento de muestras	16	Protocolos:	
Procedimiento	17	■ Valoración de las muestras (manual)	73
Extracción y preparación del ADN	17	■ Detección de mutaciones de EGFR (manual)	73
Protocolos:		■ Configuración del kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR con el software Rotor-Gene Q	74
■ Valoración de las muestras	18	Interpretación de los resultados (manual)	78
■ Detección de mutaciones de EGFR	29	Configuración del análisis del software	78
Interpretación de los resultados (automática)	41	Análisis de los datos de valoración de las muestras	79
Indicadores del software <i>therascreen</i> EGFR Assay Package para Rotor-Gene Q	42	Análisis de los datos de la detección de mutaciones del gen EGFR	80
Guía de resolución de problemas	48	Apéndice B: instalación del software <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package	87
Control de calidad	49	Información de contacto	89
Limitaciones	49	Información para pedidos	90
Características de rendimiento	50		
Rendimiento analítico	50		
Límite de blanco (LOB), intervalo de funcionamiento y valores de corte	50		
Impacto del ADN introducido sobre los valores de ΔC_T	52		
Reactividad cruzada	52		
Exactitud: comparación con el método de referencia analítico	52		
Valores del límite de detección (LOD)	53		
Interferencia	55		

Uso previsto

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR es una prueba de diagnóstico *in vitro* diseñada para la detección de 29 mutaciones somáticas en el gen EGFR. Proporciona una valoración cualitativa del estado de mutación en muestras tumorales obtenidas de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

Los resultados tienen como objetivo ayudar al personal médico a identificar pacientes con NSCLC que puedan beneficiarse de un tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa del EGFR.

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR analiza muestras de ADN extraídas de tejido tumoral fijado en formalina e impregnado en parafina (FFPE) de pacientes con NSCLC y se ejecuta en el equipo Rotor-Gene Q MDx. Está concebido para el uso por parte de personal cualificado en entornos profesionales de laboratorio.

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

Resumen y explicación

En los cánceres humanos (1, 2), el oncogén EGFR presenta mutaciones. La existencia de estas mutaciones se relaciona con la respuesta a determinadas terapias de inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) (3-8). Este tipo de mutaciones en el oncogén EGFR están presentes en la población general de pacientes con NSCLC con una frecuencia aproximada del 10% en pacientes de EE.UU., Europa o Australia y hasta del 30% en pacientes de Japón y Taiwán (1, 2, 9).

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

Gracias a las tecnologías Scorpions® (10) y ARMS (amplificación refractaria de sistemas de mutaciones) (11), el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR permite detectar 29 mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del oncogén EGFR en ADN genómico nativo (tabla 1). En resumen,

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

- T790M
- L858R
- L861Q

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 ADN mutante en ADN genómico nativo. Los límites de selectividad y detección son superiores a los de otras tecnologías como la de secuenciación mediante terminadores fluorescentes.

Tabla 1. Lista de mutaciones e identificadores COSMIC

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Deleciones	12384	2237_2255>T
		12387	2239_2258>CA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		13551	2235_2252>AAT
		12678	2237_2251del15
		6218	2239_2247del9
		12728	2236_2253del18
		12367	2237_2254del18
		6210	2240_2251del12
		6220	2238_2255del18
	6223	2235_2249del15	
	6225	2236_2250del15	

* COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer:
<http://cancer.sanger.ac.uk/>

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

La tabla continúa en la página siguiente.

7065

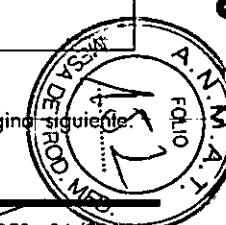


Tabla 1. Continuación

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base
19	Deleciones	6254	2239_2253del15
		6255	2239_2256del18
		12369	2240_2254del15
		12370	2240_2257del18
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C
		12383	2239_2251>C
20	S768I	6241	2303G>T
	Inserciones	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
T790M	6240	2369C>T	
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

* COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer:
<http://cancer.sanger.ac.uk/>

Principio del procedimiento

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR incluye 8 mezclas de reacción distintas de amplificación mediante PCR: 7 reacciones específicas para mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del oncogén EGFR, y un control nativo para el exón 2. A continuación se explican los componentes del principio del kit.

ARMS

La tecnología ARMS permite llevar a cabo una amplificación específica de los alelos o las 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 primer 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 primer 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 nivel bajo.

Scorpions

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

Formato del kit

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

- 1 ensayo de control (CTRL)
- 7 ensayos de mutación

Todas las mezclas de reacción contienen reactivos para la detección de dianas marcadas con carboxifluoreceína (FAM™), además de un control interno marcado con hexafluoro fluoresceína (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 reacción de PCR errónea.

Ensayos

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

Ensayo de control

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

Ensayos de mutación

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

Controles

Nota: todas las series experimentales deben utilizar controles positivos y negativos.

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 que sirve 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 ("no template control", control sin molde o NTC) en los tubos del 9 al 16. El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR contiene agua para el control sin molde (NTC), que 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 (IC), además de la reacción diana. Un error indica que pueden existir inhibidores que podrían derivar en un resultado inexacto o bien que se ha producido un error de configuración del usuario para ese tubo. El IC utiliza una secuencia diana para oligonucleótidos anti-EGFR, un primer sin marcar y un primer Scorpions marcado con HEX para diferenciarlo de los marcadores Scorpions marcados con FAM en las mezclas de reacción de control y mutación. La amplificación de FAM puede dejar fuera de competencia a la amplificación del IC, por lo que el valor de C_T (HEX) del IC generado podría estar fuera del rango especificado. Los resultados de FAM siguen siendo válidos para estas muestras.

Valoración de las muestras

Se recomienda encarecidamente utilizar la mezcla de reacción para control (tubo para CTRL) suministrada con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR a fin de valorar el ADN total amplificable de EGFR de la 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 control positivo y agua para el "molde" como 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 (tubo para CTRL) adicional para valorar la calidad y la cantidad de las muestras de ADN antes del análisis con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

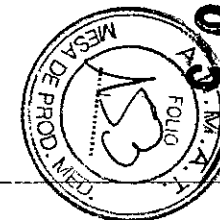
Plataforma y programa

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se ha diseñado específicamente para su uso con equipos Rotor-Gene Q MDx. El equipo Rotor-Gene Q MDx puede programarse para distintos parámetros de ciclo, o "series analíticas", con el software *therascreen* EGFR CE Assay Package.

El software *therascreen* EGFR CE Assay Package consta de dos moldes: "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" (para la valoración de las muestras) y "therascreen EGFR CE Locked Template" (para la detección de mutaciones de EGFR). Dichos moldes contienen los parámetros de análisis de la PCR y se encargan de calcular los resultados.

También se puede utilizar el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR con el software Rotor-Gene Q versión 2.3 en modo abierto (es decir, sin utilizar el software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Para obtener información detallada, consulte el "Apéndice A: protocolo manual del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR" en la página 64.

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



Materiales suministrados

Contenido del kit

therascreen EGFR RGQ PCR Kit		(24)	
Referencia		874111	
Número de reacciones		24	
Color	Identidad	Tubo ID	Volumen
Rojo	Control Reaction Mix (mezcla de reacción para control)	1 CTRL	2 x 600 µl
Púrpura	T790M Reaction Mix (mezcla de reacción para T790M)	2 T790M	600 µl
Naranja	Deletions Reaction Mix (mezcla de reacción para deleciones)	3 Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (mezcla de reacción para L858R)	4 L858R	600 µl
Verde	L861Q Reaction Mix (mezcla de reacción para L861Q)	5 L861Q	600 µl
Amarillo	G719X Reaction Mix (mezcla de reacción para G719X)	6 G719X	600 µl
Gris	S768I Reaction Mix (mezcla de reacción para S768I)	7 S768I	600 µl
Azul	Insertions Reaction Mix (mezcla de reacción para inserciones)	8 Ins	600 µl
Beis	EGFR Positive Control (control positivo de EGFR)	9 PC	300 µl
Menta	Taq DNA Polymerase (Taq ADN polimerasa)	Taq	2 x 80 µl
Blanco	Agua exenta de nucleasas para el control sin molde	NTC	1,9 ml
Blanco	Agua exenta de nucleasas para la dilución	Dil.	1,9 ml

therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook
(manual de uso en inglés)

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

Asegúrese de que se hayan revisado y calibrado los equipos según las recomendaciones del fabricante.

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 seguridad (SDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

Reactivos

- Kit para el aislamiento de ADN (consulte "Extracción y preparación del ADN", en la página 17)

Fungibles y equipo de laboratorio general

- Pipetas exclusivas* (ajustables) para la preparación de muestras
- Pipetas exclusivas* (ajustables) para la preparación de la master mix 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, se recomiendan puntas de pipeta con barreras para aerosoles)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (tubos y tapones de tiras de 0,1 ml) para uso con un rotor de 72 pocillos (referencia 981103 o 981106)
- Tubos de microcentrífuga exentos de DNAsa, RNAsa y ADN para la preparación de las master mix
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (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 (referencia 9018901)
- Agitador calentador*, incubador orbital térmico*, bloque térmico* o baño de agua* que permita la incubación a 90 °C
- Centrífuga de mesa* con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Agitador vórtex*

Equipo para la PCR

- Equipo Rotor-Gene Q MDx con canales de fluorescencia para Cycling Green y Cycling Yellow (detección de FAM y HEX, respectivamente)*†
- Software Rotor-Gene Q, versión 2.3
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package CD versión 3.0.5 (referencia 9023537)

Nota: el software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package requiere el software Rotor-Gene Q versión 2.3.

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 seguridad (SDS). Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

Para obtener información de seguridad sobre el equipo Rotor-Gene Q, consulte el manual del usuario que se suministra con el mismo.

Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los requisitos de seguridad local.

Precauciones generales

Debe procederse siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- La prueba se ha diseñado para su uso con muestras FFPE de NSCLC.
- Almacene y extraiga el material positivo (muestras y controles positivos) por separado del resto de reactivos y añádale a la mezcla de reacción en una zona separada físicamente.

* Asegúrese de que se hayan revisado y calibrado los equipos según las recomendaciones del fabricante.

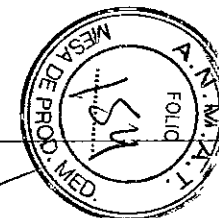
† En otros países, si corresponde, se puede utilizar el equipo Rotor-Gene Q 5plex HRM con una fecha de producción de mayo de 2011 o posterior. La fecha de producción se puede obtener del número de serie situado en la parte posterior del equipo. El número de serie presenta el formato "mmaann", donde "mm" indica el mes de producción en dígitos, "aa" indica los dos últimos dígitos del año de producción y "nnn" indica el identificador exclusivo del equipo.

- Extrema 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.
- Todos los materiales químicos y biológicos son potencialmente peligrosos. Las muestras son material potencialmente infeccioso y deben tratarse como material biopeligroso.
- Los reactivos del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR presentan una dilución óptima. No debe realizarse una mayor dilución de los reactivos puesto que podrían perder eficacia. No utilice volúmenes de reacción (mezcla de reacción más muestra) inferiores a 25 µl puesto que su uso aumenta el riesgo de falsos negativos.
- Todos los reactivos suministrados en el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo kit: *therascreen* EGFR RGQ PCR. No sustituya los reactivos del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR ni los mezcle con los de otros kits *therascreen* EGFR RGQ PCR, ya que el rendimiento podría verse afectado.
- Utilice únicamente la *Taq* ADN polimerasa (tubo para CTRL *Taq*) suministrada con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. No la sustituya por *Taq* ADN polimerasa de otros kits del mismo o de otro tipo ni por *Taq* ADN polimerasa de otro fabricante.
- No utilice componentes caducados o mal almacenados.

Nota: es importante controlar que las pruebas se realicen correctamente, haciendo especial hincapié en la eliminación incorrecta de muestras, los errores de carga y los errores de pipeteo.

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

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



Almacenamiento y manipulación de reactivos

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se suministra en hielo seco y debe seguir 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 o con su distribuidor local (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 y -30 °C y protéjalo de la luz. Los primers Scorpions (así como todas las moléculas marcadas con fluorescencia) deben protegerse de la luz para evitar el blanqueamiento y la pérdida de rendimiento. 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 8 ciclos de congelación-descongelación.

Los reactivos deben descongelarse a temperatura ambiente ($15-25$ °C) durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 4,5 horas. Cuando los reactivos están listos para ser utilizados, pueden configurarse las reacciones de PCR. Los tubos de Rotor-Gene Q, que contienen las mezclas maestra y la muestra de ADN, pueden cargarse en el instrumento Rotor-Gene Q MDx inmediatamente. El tiempo total previo al análisis después de configurar las reacciones de PCR no debería superar:

- 7 horas si se almacenan a temperatura ambiente

Nota: este tiempo incluye tanto la configuración de la PCR como el almacenamiento.

- 18 horas si se almacenan en un congelador ($2-8$ °C)

Nota: este tiempo incluye tanto la configuración de la PCR como el almacenamiento.

Nota: para garantizar una actividad y un rendimiento óptimos, los primers 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.

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 tejido 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 que detecta el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Para preparar las muestras de tejido para la extracción del ADN:

- Con los materiales y métodos estándares, fije la muestra de tejido en formalina con tampón neutral (NBF) al 10% y fije la muestra de tejido en parafina. Con un microtomo, corte secciones en serie de 5 μ m del bloque de parafina y colóquelas en un portaobjetos de vidrio.
- Recorra a un profesional cualificado (p. ej., un patólogo) para valorar la sección teñida con hematoxilina-eosina (H&E) para confirmar si hay presencia tumoral.
- No utilice las secciones teñidas para extraer el ADN.
- Conserve todos los bloques FFPE y portaobjetos a temperatura ambiente ($15-25$ °C). Los portaobjetos pueden conservarse a temperatura ambiente durante un máximo de 1 mes antes de la extracción del ADN.

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

Procedimiento

Extracción y preparación del ADN

Las características de rendimiento de este kit se han determinado mediante ADN extraído con el kit QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue. Si se utiliza el kit con funciones equivalentes QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (referencia 56404), lleve a cabo la extracción del ADN de acuerdo con las instrucciones del manual y según las recomendaciones siguientes:

- No utilice la solución de desparafinización de QIAGEN. Utilice solamente el método xileno/etanol para desparafinización descrito en *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* (manual del kit QIAamp DNA FFPE Tissue).
- Asegúrese de utilizar etanol grado biología molecular* en todos los pasos necesarios.
- Raspe todo el tejido de 2 secciones y dépositelo en un tubo de microcentrífuga etiquetado con un bisturí nuevo para cada muestra.
- La digestión de la proteinasa K (paso 11 del manual *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) debe realizarse durante **1 hora ± 5 minutos** a una temperatura de $56\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- La incubación (paso 12 del manual *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) debe realizarse durante **1 hora ± 5 minutos** a una temperatura de $90\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- No utilice el paso de RNasa que se describe en el manual *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*.
- Las muestras deben eluirse en **120 µl** de tampón de elución (ATE) del kit QIAamp DNA FFPE Tissue (paso 20 del manual *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*).
- El ADN genómico puede conservarse a $2-8\text{ °C}$ durante 1 semana con posterioridad a la extracción, o entre $-15\text{ y }-25\text{ °C}$ durante 8 semanas antes de su uso.

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.

* No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metilacetona.

Protocolo: valoración de las muestras

Este protocolo se utiliza para valorar el ADN amplificable total de las muestras mediante el molde "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" del software Rotor-Gene Q *therascreen EGFR CE Assay Package* para la valoración automatizada de muestras.

Nota: para obtener información sobre la valoración manual de las muestras de ADN, consulte el apartado "Apéndice A: protocolo manual del kit *therascreen EGFR RGQ PCR*", en la página 64.

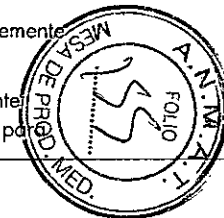
Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de iniciar el procedimiento, consulte el apartado "Precauciones generales", en la página 13.
- Tómese su tiempo para familiarizarse con el equipo Rotor-Gene Q MDx antes de iniciar el protocolo. Consulte el manual del usuario del equipo.
- No mezcle en vórtex la enzima *Taq* ni ninguna mezcla que contenga *Taq*, ya que esto inactivaría la enzima.
- Pipeteo 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.
- Pueden evaluarse hasta 24 muestras mediante la mezcla de reacción para control disponible.

Antes de comenzar

- Compruebe que se haya instalado el software *therascreen EGFR CE Assay Package* antes de utilizar el equipo Rotor-Gene Q MDx por primera vez (consulte el apartado "Apéndice B: instalación del software *therascreen EGFR CE Assay Package*" en la página 87).
- Antes de cada uso, descongele todos los reactivos durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 4,5 horas a temperatura ambiente ($15-25\text{ °C}$), mézclelos invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifúgelos brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo.
- Mezcle todas las muestras invirtiéndolas 10 veces y centrifugue brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo.
- Asegúrese de que la enzima *Taq* se encuentra a temperatura ambiente (de $15\text{ a }25\text{ °C}$) antes de cada uso. Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

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



70651

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 a 25 °C) durante 1 hora como mínimo y 4,5 horas como máximo.

En la tabla 2 se indica el tiempo necesario para descongelar los reactivos y configurar la PCR, así como el tiempo de almacenamiento previo al inicio de la serie analítica.

Tabla 2. Tiempos de descongelación, configuración de la PCR y temperaturas de almacenamiento

Tiempo de descongelación		Temp. almac. posterior a config. de PCR	Tiempo máximo config. de PCR y almacenamiento
Mínimo	Máximo		
1 h	4,5 h	Temperatura ambiente (15-25 °C)	7 h
1 h	4,5 h	2-8 °C	18 h

Nota: la configuración de la PCR se realiza a temperatura ambiente (15-25 °C). Por "Almacenamiento" se entiende el tiempo transcurrido entre la finalización de la configuración de la PCR y el inicio de la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx.

Nota: descongele la enzima *Taq* a temperatura ambiente (15-25 °C) a la vez que otros reactivos (consulte el apartado "Almacenamiento y manipulación de reactivos", en la página 15). Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

2. 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.

3. Prepare cantidades suficientes de master mix de control (mezcla de reacción para control [CTRL] más la enzima *Taq*) para muestras de ADN, una reacción de control positivo para EGFR y una reacción de control sin molde (NTC) según los volúmenes indicados en la tabla 3. Incluya reactivos para 1 muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR.

La master mix contiene todos los componentes necesarios para la PCR, salvo la muestra.

Tabla 3. Preparación de la master mix de ensayo para control

Componente	Volumen
Mezcla de reacción para control (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
<i>Taq</i> ADN polimerasa	0,5 µl × (n + 1)
Volumen total	20 µl/reacción

* n = número de reacciones (muestras y controles). Prepare volumen suficiente de master mix para una muestra adicional (n + 1) a fin de asegurar suficiente excedente para la configuración de la PCR. El valor n no debería ser superior a 26 (24 muestras, más 2 controles).

Nota: cuando prepare la master mix, añada al tubo correspondiente primero el volumen necesario de mezcla de reacción para control o mutación y, luego, la enzima *Taq*.

4. Mezcle bien la master mix pipeteando suavemente arriba y abajo 10 veces. Coloque el número adecuado de tubos de tiras en el bloque de carga según el esquema de la tabla 4. Añada inmediatamente 20 µl de master mix en cada tira de tubo para PCR.

Los tapones permanecen en el contenedor de plástico hasta que se necesitan. Para llevar a cabo la valoración de las muestras de ADN, debe añadirse la master mix para el ensayo de control a un tubo para PC, a un tubo para NTC y a un tubo para cada muestra.

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

Tabla 4. Disposición de los ensayos de valoración de muestras de ADN en el bloque de carga. Los números indican la posición en el bloque de carga y la posición final del rotor.

Ensayo	Posición								
Control	1 [PC]	9	17	25	-	-	-	-	-
Control	2 [NTC]	10	18	26	-	-	-	-	-
Control	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Control	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Control	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Control	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Control	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Control	8	16	24	-	-	-	-	-	-

- Añada inmediatamente 5 µl de agua para NTC al tubo en la posición 2 y tápelo.
- Añada 5 µl de cada muestra a los tubos de muestras (posiciones 3 a 26) y tápelos.
- Añada 5 µl de PC para EGFR al tubo en la posición 1 y tápelo.
Realice la carga o el pipeteo con cuidado para evitar errores y asegurar que el NTC, las muestras y el PC se añaden correctamente a los tubos correspondientes. Marque los tapones de los tubos para indicar la dirección en la que se deben cargar los tubos en el equipo Rotor-Gene Q MDx.
- Después de cerrar todos los tubos de PCR, realice una comprobación visual de los niveles de llenado de los tubos de muestras para asegurarse de que la muestra se ha añadido a todos los tubos.
- Invierta todos los tubos de PCR 4 veces para mezclar las muestras y las mezclas de reacción.
- Coloque los tubos de tiras de PCR en las posiciones apropiadas en el rotor de 72 pocillos según la distribución de la tabla 4.
Si el rotor no está totalmente lleno, rellene las posiciones vacías con tubos vacíos y tapados.

- Coloque inmediatamente el rotor de 72 pocillos en el equipo Rotor-Gene Q MDx. Asegúrese de que el anillo de fijación (accesorio del equipo Rotor-Gene Q MDx) se encuentra en la parte superior del rotor para proteger los tubos durante la serie.

Nota: si utiliza la valoración manual de las muestras, consulte el apartado "Apéndice A: protocolo manual del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR", en la página 64.

- Inicio el software Rotor-Gene Q. Para ello, haga doble clic en el icono "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" (Molde bloqueado para series de control de EGFR CE de *therascreen*) del escritorio del ordenador conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx (ilustración 1).



Ilustración 1. Icono de molde bloqueado para serie de control de EGFR CE (valoración de muestras)

- Se abre de manera predeterminada la pestaña "Setup" (Configuración) (ilustración 2). Confirme que el anillo de fijación esté sujeto y marque la casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de fijación sujeto). Cierre la tapa del equipo Rotor-Gene Q MDx.

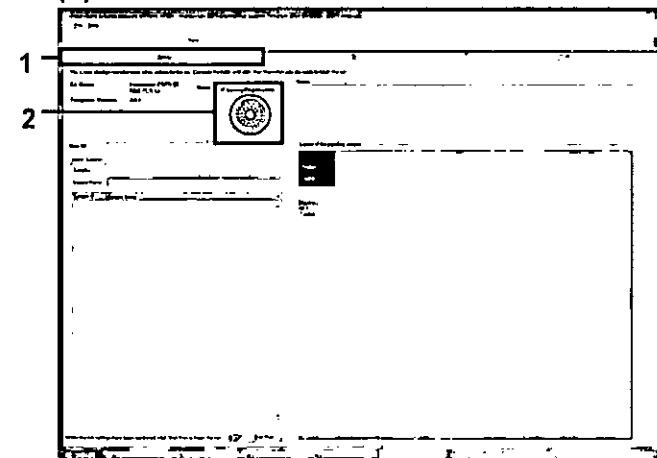
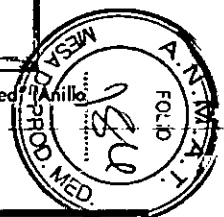


Ilustración 2. Pestaña "Setup" (Configuración) (1) y opción "Locking Ring Attached" (Anillo de fijación sujeto) (2)

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



14. Introduzca el identificador de la serie en el campo "Run ID" (Identificador de la serie) de acuerdo con la convención de nomenclatura local. Escriba el nombre de la muestra en el campo "Sample Name" (Nombre de la muestra) según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Enter.

Al hacerlo, se añade el nombre de la muestra a la lista de muestras que aparece más abajo y se le asigna un identificador ("Sample ID" 1, 2, 3, etc.). Además, se actualiza el panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo) situado a la derecha con el nombre de la muestra (ilustración 3).

Nota: también existe la posibilidad de importar los nombres de las muestras almacenadas en los formatos *.smp (archivo de muestras de Rotor-Gene Q) o *.csv (valores separados por comas) mediante el botón "Import Samples" (Importar muestras). Con este método, los nombres de las muestras se introducen automáticamente.

Nota: en el panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo), compruebe que la nueva muestra aparezca resaltada con un color distinto y que el nombre de la misma aparezca en la posición de la muestra (ilustración 3).

Nota: los nombres de las muestras con más de 8 caracteres no pueden mostrarse al completo en el panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo).

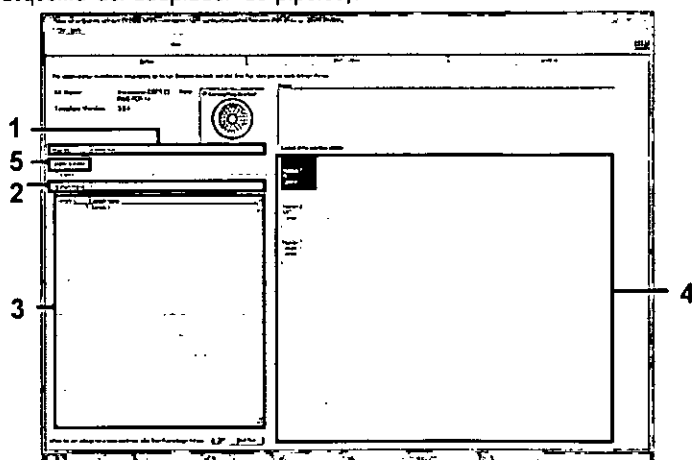


Ilustración 3. Introducción del identificador de la serie ("Run ID") y del nombre de la muestra ("Sample Name") (1 = Campo "Run ID" [Identificador de la serie], 2 = Campo "Sample Name" [Nombre de la muestra], 3 = Lista de muestras, 4 = Panel "Layout of the pipetting adapter" [Esquema del adaptador de pipeteo], 5 = Panel "Import Samples" [Importar muestras])

15. Repita el paso 14 para introducir los nombres de todas las muestras adicionales (ilustración 4).

Nota: para editar el nombre de una muestra, haga clic en la opción "Sample Name" (Nombre de la muestra) de la lista de muestras para que la muestra seleccionada aparezca en el campo "Sample Name" anterior. Modifique el nombre de la muestra según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Enter para actualizar el nombre.

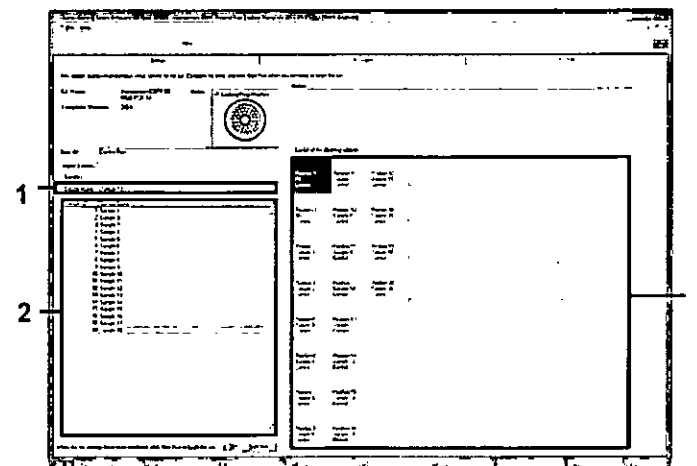


Ilustración 4. Introducción de nombres de muestra adicionales en el campo "Sample Name" (1 = Campo "Sample Name" [Nombre de la muestra], 2 = Lista de muestras, 3 = Panel "Layout of the pipetting adapter" [Esquema del adaptador de pipeteo])

16. Cuando haya terminado de introducir todos los nombres de las muestras, compruebe que sean correctos. Si es necesario, incluya cualquier información adicional en el campo "Notes" (Notas) y haga clic en "Start Run" (Iniciar la serie) (ilustración 5).

Nota: si queda alguna posición del rotor vacía, aparecerá un mensaje de advertencia ("Warning") (ilustración 5) para recordarle que deben ocuparse todas las posiciones sin utilizar del rotor con tubos vacíos tapados. Compruebe que todas las posiciones sin utilizar del rotor contengan tubos vacíos tapados y haga clic en "OK" (Aceptar) para continuar.

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

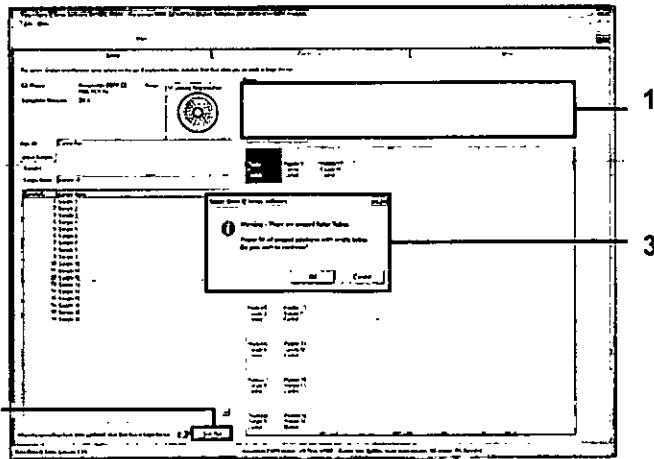


Ilustración 5. Campo "Notes" (Notas) (1), botón "Start Run" (Iniciar la serie) (2) y mensaje "Warning" (Advertencia) sobre las posiciones sin utilizar del rotor (3)

17. Se abre la ventana "Save As" (Guardar como). Seleccione un nombre de archivo adecuado y guarde la serie de PCR como un archivo ejecutable *.rex en la ubicación seleccionada. Haga clic en "Save" (Guardar) (ilustración 6).

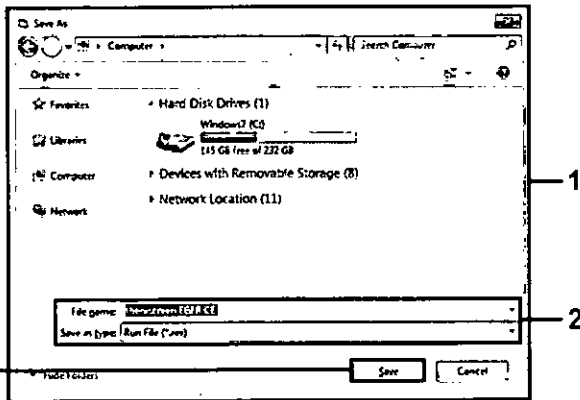


Ilustración 6. Ventana "Save As" (Guardar como) (1) (2 = Campos "File Name" (Nombre de archivo) y "Save as type" (Guardar como tipo), 3 = Botón "Save" (Guardar))

18. Comienza la serie de PCR.

Nota: cuando empieza la serie, se abre automáticamente la pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie) para mostrar el registro de la temperatura y el tiempo restante para finalizar la serie (ilustración 7).

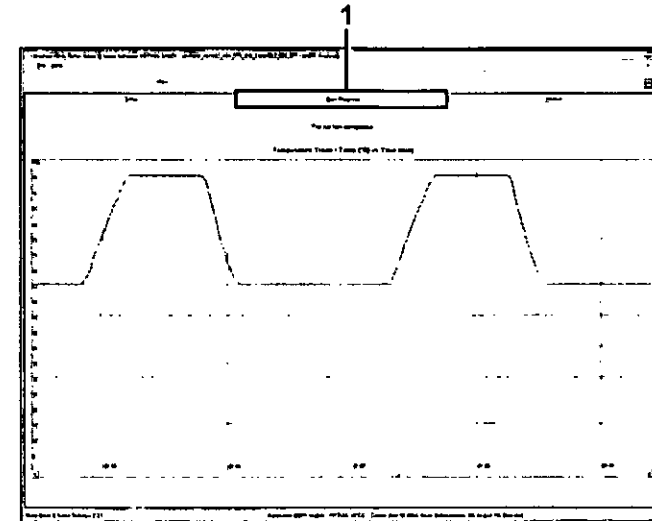


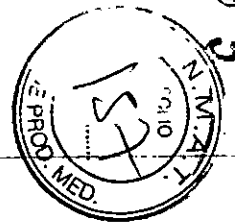
Ilustración 7. Pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie) (1)

19. Una vez finalizada la serie, se abre la pestaña "Analysis" (Análisis).

Nota: si la pestaña "Analysis" (Análisis) no se abre, haga clic en la pestaña "Analysis" (ilustración 8).

Nota: encontrará una explicación sobre el método de cálculo empleado en el apartado "Interpretación de los resultados (automática)" de la página 41.

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



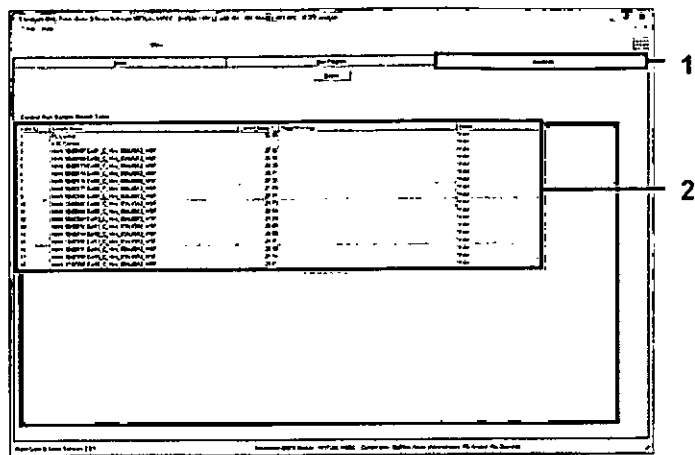


Ilustración 8. Pestaña "Analysis" (Análisis) (1) e informe de los resultados (2 = Tabla de resultados de CC de la muestra)

20. Los resultados de control se presentan de la siguiente manera en la tabla de resultados del CC de la muestra (ilustración 8).

- ❑ **Controles de la serie (PC y NTC, posiciones 1 y 2 de tubos respectivamente).**
Si los resultados están comprendidos dentro de los rangos aceptables, se indica "Valid" (Válido). De lo contrario, se muestra "Invalid" (No válido).
- ❑ **Un valor de $C_T > 31,10$ para la reacción de control de la muestra genera un resultado "Invalid" (No válido).**
No hay suficiente cantidad de ADN para realizar el análisis de mutación. Vuelva a analizar la muestra. Si la cantidad de ADN sigue siendo insuficiente, extraiga más tejido tumoral si es posible.
- ❑ **Un valor de $C_T < 23,70$ para la reacción de control de la muestra genera un resultado "Invalid" (No válido).**
La concentración de ADN es demasiado elevada para el análisis de mutación. Dilúyala con agua exenta de nucleasas para dilución (Dil.) y repita el análisis. Diluya hasta obtener un C_T comprendido entre 23,70 y 31,10. Una dilución 1:1 aumenta el valor de C_T en aproximadamente 1,0.

- ❑ **Un valor de C_T de la reacción de control de la muestra de 23,70-31,10, ($23,70 \leq C_T \text{ de control} \leq 31,10$) generará un resultado "Valid" (Válido).**
La concentración de ADN es adecuada para realizar el análisis de mutación.

Nota: si fuera necesario volver a realizar una extracción o una dilución, repita la reacción de control para confirmar que la concentración de ADN es la adecuada para realizar el análisis.

21. Haga clic en "Report" (Informe) para generar un archivo de informe. Se abre la ventana "Report Browser" (Explorador de informes). En el apartado "Templates" (Moldes), seleccione "EGFR CE Analysis Report" (Informe del análisis de EGFR CE) y luego haga clic en "Show" (Mostrar) (ilustración 9).

Nota: para guardar los informes en otra ubicación en formato de archivo Web, haga clic en "Save As" (Guardar como) en la esquina superior izquierda de cada informe.

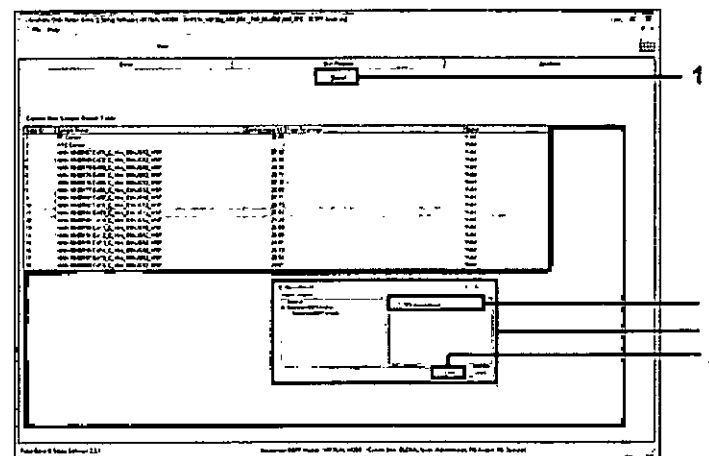


Ilustración 9. Selección del informe de análisis de EGFR CE ("EGFR CE Analysis Report") (1 = Botón "Report" [Informe], 2 = Ventana "Report Browser" [Explorador de informes], 3 = Selección "EGFR Analysis Report" [Informe del análisis de EGFR], 4 = Botón "Show" [Mostrar])

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

Protocolo: detección de mutaciones de EGFR

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

Nota: para obtener información sobre la detección manual de las muestras, consulte el apartado "Apéndice A: protocolo manual del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR", en la página 64.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de iniciar el procedimiento, consulte el apartado "Precauciones generales" en la página 13.
- Tómese su tiempo para familiarizarse con el equipo Rotor-Gene Q MDx antes de iniciar el protocolo. Consulte el manual del usuario del equipo.
- Las muestras se pueden analizar con los ensayos de mutación de EGFR siempre y cuando hayan superado el proceso de valoración de muestras de ADN.
- Para utilizar el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR de forma eficaz, es preciso agrupar las muestras en lotes de 7. Un tamaño de lote inferior implica una capacidad de análisis de muestras inferior con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Las muestras deben analizarse con todas las mezclas de reacción suministradas en el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- No mezcle en vórtex la enzima *Taq* ni ninguna mezcla que contenga *Taq*, ya que esto inactivaría la enzima.
- Pipetee la enzima *Taq*. Para ello, introduzca con cuidado 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

- Compruebe que se haya instalado el software *therascreen* EGFR CE Assay Package antes de utilizar el equipo Rotor-Gene Q MDx por primera vez (consulte el apartado "Apéndice B: instalación del software *therascreen* EGFR CE Assay Package" en la página 87).

- Antes de cada uso, descongele todos los reactivos durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 4,5 horas a temperatura ambiente (15-25 °C), mézclelos invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifúguelos brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo.
- Mezcle todas las muestras invirtiéndolas 10 veces y centrifugue brevemente para que el contenido se deposite en el fondo del tubo.
- Asegúrese de que la enzima *Taq* se encuentra a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de cada uso. Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

Procedimiento

1. **Descongele todos los tubos de mezcla de reacción, agua para control sin molde (NTC) y el control positivo (PC) de EGFR a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C) durante 1 hora como mínimo y 4,5 horas como máximo.**

En la tabla 5 se indica el tiempo necesario para descongelar los reactivos y configurar la PCR, así como el tiempo de almacenamiento previo al inicio de la serie analítica.

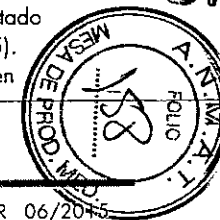
Tabla 5. Tiempos de descongelación, configuración de la PCR y temperaturas de almacenamiento

Tiempo de descongelación		Temp. almac. posterior a config. de PCR	Tiempo máximo config. de PCR y almacenamiento
Mínimo	Máximo		
1 h	4,5 h	Temperatura ambiente (15-25 °C)	7 h
1 h	4,5 h	2-8 °C	18 h

Nota: la configuración de la PCR se realiza a temperatura ambiente (15-25 °C). Por "Almacenamiento" se entiende el tiempo transcurrido entre la finalización de la configuración de la PCR y el inicio de la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx.

Nota: descongele la enzima *Taq* (tubo para *Taq*) a temperatura ambiente (15-25 °C) a la vez que el resto de los reactivos (consulte el apartado "Almacenamiento y manipulación de reactivos", en la página 15). Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

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



7065

2. 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.
3. Prepare cantidades suficientes de master mix de ensayo (mezcla de reacción para ensayo más la enzima Taq) para las muestras de ADN, un control positivo (PC) para EGFR y una reacción de control sin molde (NTC) según los volúmenes indicados en la tabla 6. Incluya reactivos para 1 muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR.

Las master mix contienen todos los componentes necesarios para la PCR, salvo la muestra.

Tabla 6. Preparación de las master mix del ensayo

Ensayo	Tubo para mezcla de reacción	Volumen de mezcla de reacción	Volumen de Taq ADN polimerasa (tubo para Taq)
Control	CTRL	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
T790M	T790M	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
Deleciones	Del	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
L858R	L858R	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
L861Q	L861Q	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
G719X	G719X	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
S768I	S768I	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
Inserciones	Ins	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$

* n = número de reacciones (muestras y controles). Prepare volumen suficiente de master mix para una muestra adicional (n + 1) a fin de asegurar suficiente excedente para la configuración de la PCR. El valor n no debería ser superior a 7 (más los controles), puesto que 7 es el número máximo de muestras por serie analítica.

4. Mezcle bien la master mix de ensayo pipeteando suavemente arriba y abajo 10 veces. Coloque el número adecuado de tubos de tiras en el bloque de carga según el esquema de la tabla 7. Añada inmediatamente 20 μl de la master mix de ensayo correspondiente en cada tira de tubos para PCR.

Los tapones permanecen en el contenedor de plástico hasta que se necesitan.

Tabla 7. Disposición de los ensayos de control y mutación en el bloque de carga. Los números indican la posición en el bloque de carga y la posición final del rotor.

Ensayo	Posición								
	Controles		Número de muestras						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Control	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

5. Añada inmediatamente 5 μl de agua para NTC a los tubos de las posiciones 9-16 y tápelos.
6. Añada 5 μl de cada muestra a los tubos de muestras (posiciones de tubos 17-24, 25-32, 33-40, 41-48, 49-56, 57-64 y 65-72) y tápelos.
7. Añada 5 μl de PC para EGFR a los tubos en la posición 1-8 y tápelos.

Realice la carga o el pipeteo con cuidado para evitar errores y asegurar que el NTC, las muestras y el PC para EGFR se añaden correctamente a los tubos correspondientes.

Cada tubo debería contener un volumen de reacción total de 25 μl (20 μl de master mix de ensayo preparada en el paso 3 de la tabla 6 más 5 μl de NTC/muestra/PC). Los números indican la posición en el bloque de carga y la posición final del rotor.

Marque los tapones de los tubos para indicar la dirección en la que se deben cargar los tubos en el equipo Rotor-Gene Q MDx.

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 8483
DT - TECNOLAB S.A.

8. Después de cerrar todos los tubos de PCR, realice una comprobación visual de los niveles de llenado de los tubos de muestras para asegurarse de que la muestra se ha añadido a todos los tubos.
9. Invierta todos los tubos de PCR 4 veces para mezclar las muestras y las mezclas de reacción.

10. Coloque los tubos de tiras de PCR en las posiciones apropiadas en el rotor de 72 pocillos según la distribución de la tabla 7.

Cada serie de PCR admite un máximo de 7 muestras. Si el rotor no está totalmente lleno, rellene las posiciones vacías con tubos vacíos y tapados.

11. Coloque inmediatamente el rotor de 72 pocillos en el equipo Rotor-Gene Q MDx. Asegúrese de que el anillo de fijación (accesorio del equipo Rotor-Gene Q MDx) se encuentra en la parte superior del rotor para proteger los tubos durante la serie.

Nota: si utiliza la detección de mutación de EGFR, consulte el apartado "Apéndice A: protocolo manual del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR", en la página 64.

12. Inicie el software Rotor-Gene Q. Para ello, haga doble clic en el icono "*therascreen* EGFR CE Locked Template" (Molde bloqueado de EGFR CE de *therascreen*) del escritorio del ordenador conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx (ilustración 10).



Ilustración 10. Icono de molde bloqueado de EGFR CE (detección de mutaciones de EGFR)

13. Se abre de manera predeterminada la pestaña "Setup" (Configuración) (ilustración 11). Confirme que el anillo de fijación esté sujeto y marque la casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de fijación sujeto). Cierre la tapa del equipo Rotor-Gene Q MDx.

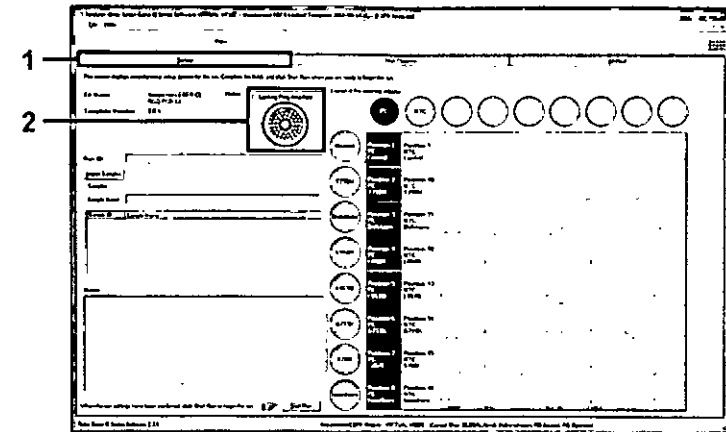


Ilustración 11. Pestaña "Setup" (Configuración) (1) y opción "Locking Ring Attached" (Anillo de fijación sujeto) (2)

14. Introduzca el identificador de la serie en el campo "Run ID" (Identificador de la serie) de acuerdo con la convención de nomenclatura local. Escriba el nombre de la muestra en el campo "Sample Name" (Nombre de la muestra) según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Enter.

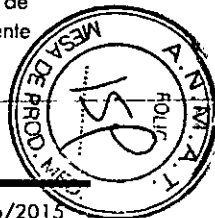
Al hacerlo, se añade el nombre de la muestra a la lista de muestras que aparece más abajo y se le asigna un identificador ("Sample ID" 1, 2, 3, etc.). Además, se actualiza el panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo) situado a la derecha con el nombre de la muestra (ilustración 12).

Nota: también existe la posibilidad de importar los nombres de las muestras almacenadas en los formatos *.smp (archivo de muestras de Rotor-Gene Q) o *.csv (valores separados por comas) mediante el botón "Import Samples" (Importar muestras). Con este método, los nombres de las muestras se introducen automáticamente.

Nota: en el panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo), compruebe que la nueva muestra aparezca resaltada con un color distinto y que el nombre de la misma aparezca en la posición de la muestra (ilustración 12).

Nota: pueden añadirse un máximo de 7 muestras. Los identificadores de las muestras (en los círculos de las muestras) se asignan automáticamente del 1 al 7.

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



7065

Nota: los nombres de las muestras con más de 8 caracteres no pueden mostrarse al completo en el panel "Layout of the pipetting adapter" (Esquema del adaptador de pipeteo).

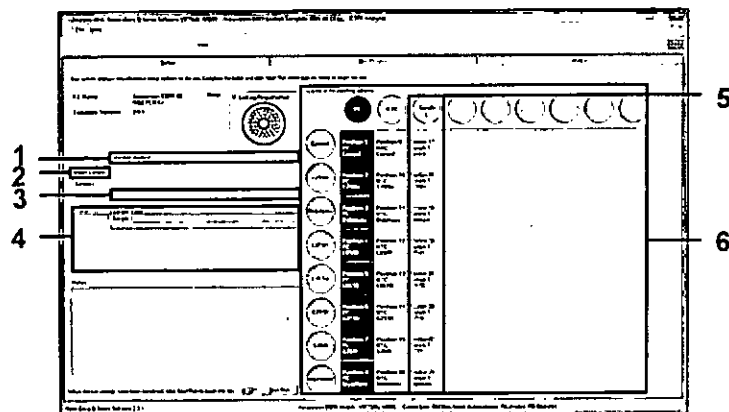


Ilustración 12. Introducción del identificador de la serie ("Run ID") y del nombre de la muestra ("Sample Name") (1 = Campo "Run ID" (Identificador de la serie), 2 = Botón "Import Samples" (Importar muestras), 3 = Campo "Sample Name" (Nombre de la muestra), 4 = Lista de muestras, 5 = Panel "Layout of the pipetting adapter" [Esquema del adaptador de pipeteo], 6 = Círculo de la muestra resaltado y panel inferior con columna de 8 ensayos)

15. Repita el paso 14 para introducir los nombres de todas las muestras adicionales (ilustración 13).

Nota: para editar el nombre de una muestra, haga clic en la opción "Sample Name" (Nombre de la muestra) de la lista de muestras para que la muestra seleccionada aparezca en el campo "Sample Name" anterior. Modifique el nombre de la muestra según la convención de nomenclatura local y pulse la tecla Enter para actualizar el nombre.

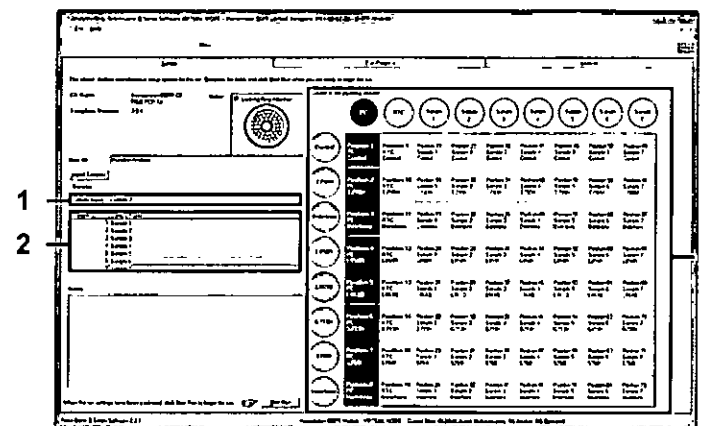


Ilustración 13. Introducción de nombres de muestra adicionales en el campo "Sample Name" (1 = Campo "Sample Name" (Nombre de la muestra), 2 = Lista de muestras, 3 = Panel "Layout of the pipetting adapter" [Esquema del adaptador de pipeteo])

16. Cuando haya terminado de introducir todos los nombres de las muestras, compruebe que sean correctos. Si es necesario, incluya cualquier información adicional en el campo "Notes" (Notas) y haga clic en "Start Run" (Iniciar la serie) (ilustración 14).

Nota: si queda alguna posición del rotor vacía, aparecerá un mensaje de advertencia ("Warning") (ilustración 14) para recordarle que deben ocuparse todas las posiciones sin utilizar del rotor con tubos vacíos tapados. Compruebe que todas las posiciones sin utilizar del rotor contengan un tubo vacío tapado y haga clic en "OK" (Aceptar) para continuar.

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

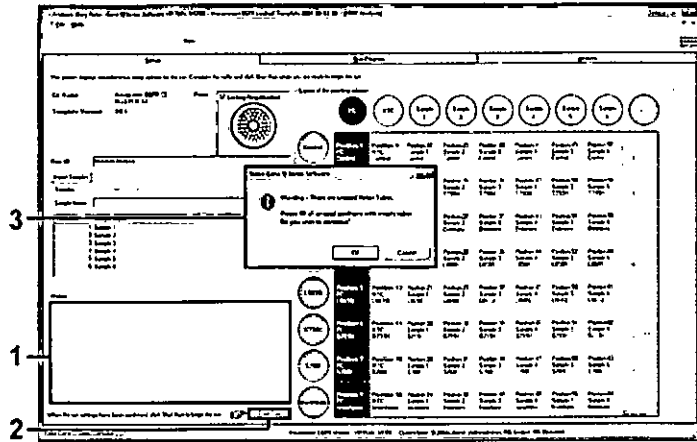


Ilustración 14. Campo "Notes" (Notas) (1), botón "Start Run" (Iniciar la serie) (2) y mensaje "Warning" (Advertencia) sobre las posiciones sin utilizar del rotor (3)

17. Se abre la ventana "Save As" (Guardar como). Seleccione un nombre de archivo adecuado y guarde la serie de PCR como un archivo ejecutable *.rex en la ubicación seleccionada. Haga clic en "Save" (Guardar) (ilustración 15).

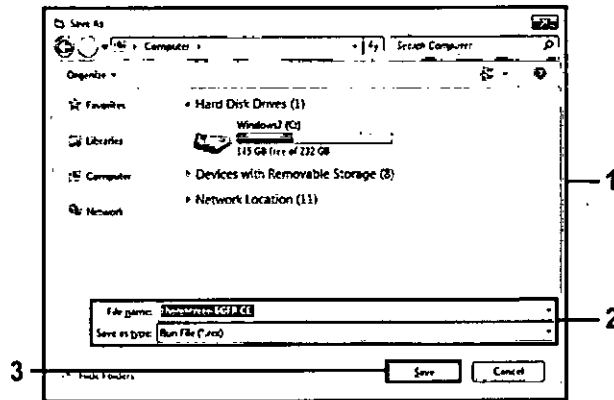


Ilustración 15. Ventana "Save As" (Guardar como) (1) (2 = Campos "File Name" (Nombre de archivo) y "Save as type" (Guardar como tipo), 3 = Botón "Save" (Guardar)

18. Comienza la serie de PCR.

Nota: cuando empieza la serie, se abre automáticamente la pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie) para mostrar el registro de la temperatura y el tiempo restante para finalizar la serie (ilustración 16).

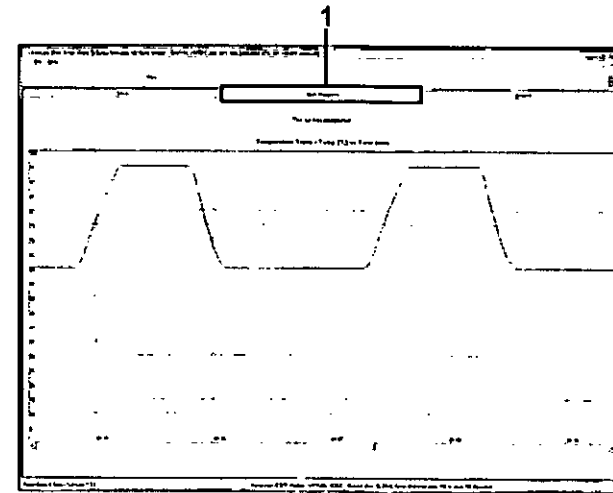


Ilustración 16. Pestaña "Run Progress" (Progreso de la serie)

19. Una vez finalizada la serie, se abre la pestaña "Analysis" (Análisis).

Nota: si la pestaña "Analysis" (Análisis) no se abre, haga clic en la pestaña "Analysis" (ilustración 17).

Nota: encontrará una explicación sobre el método de cálculo empleado en el apartado "Interpretación de los resultados (automática)" de la página 41.

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



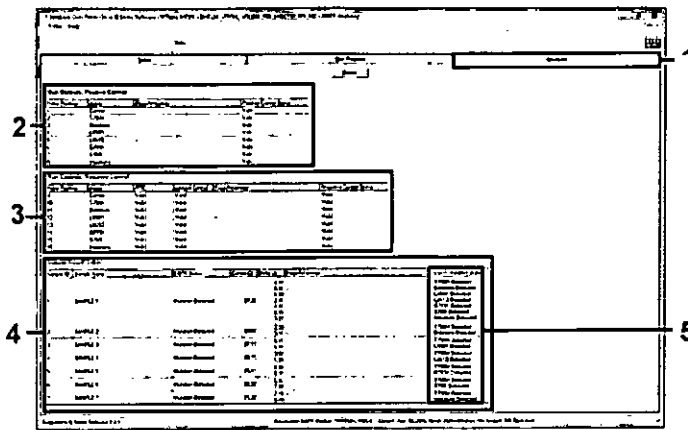


Ilustración 17. Pestaña "Analysis" (Análisis) (1) e informe de los resultados (2 = Panel "Run Controls, Positive Control" [Controles de la serie, control positivo], 3 = Panel "Run Controls, Negative Control" [Controles de la serie, control negativo], 4 = Panel "Sample Result Table" [Tabla de resultados de la muestra], 5 = Panel "Mutation Status" [Estado de la mutación])

20. Los resultados del ensayo se presentan de la siguiente manera (ilustración 18).

- **Run Controls, Positive Control (Controles de la serie, control positivo)**
Si los resultados se hallan dentro del rango aceptable, en la columna "Positive Control Status" (Estado del control positivo) aparecerá un resultado "Valid" (Válido); de lo contrario, aparecerá un resultado "Invalid" (No válido).
- **Run Controls, Negative Control (Controles de la serie, control negativo)**
Si tanto el resultado para "NTC" como para "Internal Control" (Control interno) se hallan dentro de los intervalos aceptables, aparecerá un resultado "Valid" (Válido) en la columna "Negative Control Status" (Estado del control negativo); de lo contrario, aparecerá un resultado "Invalid" (No válido).
- **Sample Result Table (Tabla de resultados de la muestra)**
En la columna "EGFR Mutation Status" (Estado de la mutación de EGFR) se muestran las mutaciones específicas detectadas en las muestras positivas para la mutación.

21. Haga clic en "Report" (Informe) para generar un archivo de informe. Se abre la ventana "Report Browser" (Explorador de informes). En el apartado "Templates" (Moldes), seleccione "EGFR CE Analysis Report" (Informe del análisis de EGFR CE) y luego haga clic en "Show" (Mostrar) (ilustración 18).

Nota: para guardar un informe en otra ubicación en formato de archivo Web, haga clic en "Save As" (Guardar como) en la esquina superior izquierda de cada informe.

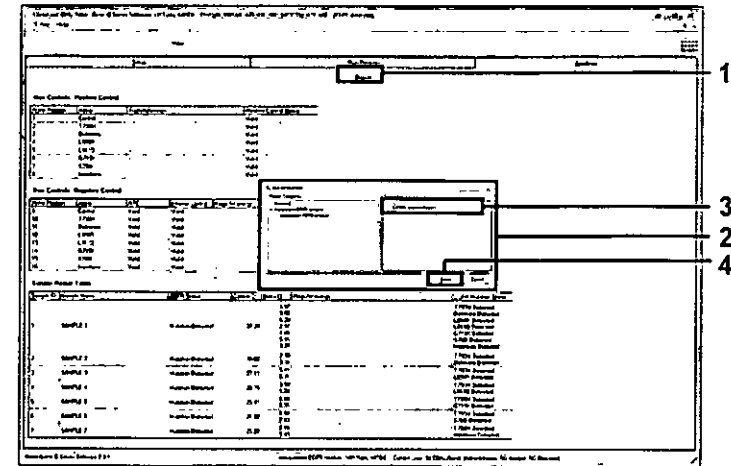


Ilustración 18. Selección del informe de análisis de EGFR CE ("EGFR CE Analysis Report") (1 = Botón "Report" [Informe], 2 = Panel "Report Browser" [Explorador de informes], 3 = Botón "EGFR CE Analysis Report" [Informe del análisis de EGFR CE], 4 = Botón "Show" [Mostrar])

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

Interpretación de los resultados (automática)

El software *therascreen* EGFR Assay Package realiza automáticamente el análisis y la identificación de las mutaciones en cuanto finaliza la serie analítica. A continuación se explican los métodos empleados por el software *therascreen* EGFR Assay Package para realizar el análisis y la identificación de las mutaciones.

Nota: para obtener información sobre el análisis manual de los resultados, consulte el apartado "Interpretación de los resultados (manual)", en la página 78.

El ciclo de PCR en el que la fluorescencia de una determinada reacción alcanza el valor umbral se define como valor de C_T . Los valores de C_T indican la cantidad de ADN específico introducido. Los valores de C_T bajos indican niveles más altos de ADN introducido, mientras que los valores de C_T altos indican niveles más bajos de ADN introducido. Las reacciones con un valor de C_T se consideran positivas para la amplificación.

El software Rotor-Gene Q interpola las señales de fluorescencia registradas entre 2 valores cualesquiera. Por lo tanto, los valores de C_T pueden ser cualquier número real (no solamente enteros) comprendido entre 0 y 40. Para el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, el valor umbral definido es 0,075 unidades de fluorescencia relativas para el canal verde (FAM) y 0,02 para el canal amarillo (HEX). Estos valores se configuran automáticamente en el software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package. Se revisan los controles de la serie (PC, NTC e IC) para asegurar la obtención de valores de C_T aceptables y que las reacciones se realicen correctamente.

Los valores de ΔC_T de la muestra se calculan para cada ensayo de mutación mediante la ecuación:

$$\Delta C_T = [\text{valor de } C_T \text{ del ensayo de mutación}] - [\text{valor de } C_T \text{ del ensayo de control}]$$

Las muestras se clasifican como positivas para la mutación cuando su valor de ΔC_T es inferior o igual al valor de ΔC_T de corte de dicho ensayo. Por encima de este valor, se considera que la muestra no alcanza el porcentaje de mutación detectable por el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (por encima del límite de los ensayos) o que la muestra es negativa para la mutación, lo que se indicaría con el resultado "No Mutation Detected" (Mutación no detectada).

La ausencia de amplificación en las reacciones para mutación se clasifica como "No Mutation Detected" (Mutación no detectada). Se prevé que los valores de ΔC_T calculados a partir de la amplificación del fondo sean superiores a los

valores de ΔC_T de corte, en cuyo caso la muestra se clasifica como "No Mutation Detected".

Los resultados del ensayo pueden ser "Mutation Detected" (Mutación detectada), "No Mutation Detected" (Mutación no detectada), "Invalid" (No válida) o "Run Control Failed" (Control de la serie erróneo) si alguno de los controles de la serie da error. En el caso de las muestras positivas para la mutación, se indican las mutaciones específicas detectadas. Un tumor puede contener más de una mutación. En dichos casos, se indica más de una mutación.

Indicadores del software *therascreen* EGFR Assay Package para Rotor-Gene Q

En la tabla 8 se indican los posibles indicadores que puede generar el software *therascreen* EGFR Assay Package en el equipo Rotor-Gene Q, su significado y las acciones recomendadas.

Los nombres de los indicadores se generan de manera que proporcionen información sobre el componente afectado del kit, la muestra o el control afectados y el modo del error.

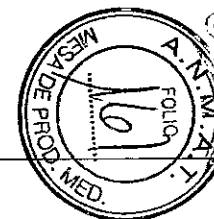
Por ejemplo:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = El ensayo de control (CTRL_ASSAY) del control positivo (PC) da error (FAIL).
- NTC_INT_CTRL_FAIL = El control interno (INT_CTRL) del control sin molde (NTC) da error (FAIL).
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = El ensayo de control (CTRL) de la muestra (SAMPLE) tiene una concentración elevada (HIGH_CONC).

Tabla 8. Indicadores, significado y acciones

Indicador	Significado	Acción
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Serie de PCR no válida: el valor de C_T de FAM está fuera del intervalo para el control positivo de la reacción para control.	Repita toda la serie de PCR.

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



Indicador	Significado	Acción
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Serie de PCR no válida: el valor de C _T de FAM está fuera del intervalo para una o más reacciones para control de mutación.	Repita toda la serie de PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia del control positivo (mezcla de reacción para control o CTRL).	Repita toda la serie de PCR.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia del control positivo (mezcla de reacción para la mutación).	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Serie de PCR no válida: control interno por encima del intervalo para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Serie de PCR no válida: control interno por debajo del intervalo para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INVALID_CT	Serie de PCR no válida: valor de FAM no válido (inferior al límite) para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.
NTC_INVALID_DATA	Serie de PCR no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control negativo.	Repita toda la serie de PCR.

Indicador	Significado	Acción
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Muestra no válida: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control de la muestra.	Configure una PCR nueva para repetir las muestras relevantes.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Muestra no válida: valor de C _T de FAM demasiado bajo para el control de la muestra.	Diluya la muestra para aumentar el valor de C _T del control. Calcule la dilución teniendo en cuenta que una dilución 1:1 con el agua suministrada con el kit permite aumentar el valor de C _T en 1,0; cuando haya diluido la muestra, configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Muestra no válida: valor de C _T de FAM demasiado alto para la reacción para control de la muestra.	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si sigue siendo no válida al repetir la serie de PCR, obtenga dos secciones de tejido FFPE adicionales (si están disponibles). Configure una nueva serie de PCR para analizar esta extracción. Si aún no es válida, repita la serie de PCR en la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.


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

Indicador	Significado	Acción
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Valor de C _T demasiado alto (o ausencia de C _T) para el control interno (HEX), canal FAM negativo para la mutación.	Si el estado de la muestra es válido, no es preciso realizar ninguna acción. Si el estado de la muestra no es válido:
	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. (Si lo permite el valor de C _T del ensayo de control de la muestra, diluya la muestra con el agua suministrada en el kit partiendo de la base de que una dilución 1:1 aumentará el valor de C _T de la reacción de control en 1,0.) Si sigue siendo no válida al repetir la serie de PCR, obtenga dos secciones de tejido FFPE adicionales (si están disponibles). Configure una nueva serie de PCR para analizar esta extracción. Si aún no es válida, repita la serie de PCR en la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.	
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Tubo para mutación no válido: el valor de C _T de HEX es demasiado bajo para la muestra (control interno).	Si el estado de la muestra es válido, no es preciso realizar ninguna acción. Si el estado de la muestra no es válido:
	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si sigue siendo no válida al repetir la serie de PCR, obtenga dos secciones de tejido FFPE adicionales (si están disponibles). Configure una nueva serie de PCR para analizar esta extracción. Si aún no es válida, repita la serie de PCR en la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.	

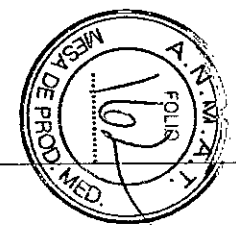
M

Indicador	Significado	Acción
SAMPLE_INVALID_DATA	Tubo para mutación no válido: no se pueden interpretar los datos de fluorescencia para el control interno.	Si el estado de la muestra es válido, no es preciso realizar ninguna acción. Si el estado de la muestra no es válido:
	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si sigue siendo no válida al repetir la serie de PCR, obtenga dos secciones de tejido FFPE adicionales (si están disponibles). Configure una nueva serie de PCR para analizar esta extracción. Si aún no es válida, repita la serie de PCR en la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.	
MUTATION_EARLY_CT	Tubo para mutación no válido: el valor de C _T de FAM es demasiado bajo para la muestra.	Si el estado de la muestra es válido, no es preciso realizar ninguna acción. Si el estado de la muestra no es válido:
	Configure una nueva serie de PCR para repetir la muestra. Si sigue siendo no válida al repetir la serie de PCR, obtenga dos secciones de tejido FFPE adicionales (si están disponibles). Configure una nueva serie de PCR para analizar esta extracción. Si aún no es válida, repita la serie de PCR en la segunda extracción. Si la muestra no genera un resultado válido al finalizar esta serie, se asignará a la muestra un estado mutacional indeterminado y no se llevará a cabo ningún otro análisis.	

7035

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

[Handwritten signature]



Indicador	Significado	Acción
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Una o más mutaciones de la muestra son válidas y positivas, a la vez que una o más mutaciones de la misma muestra no son válidas (se genera una advertencia, no un error).	Ninguna. Nota: este indicador no significa que los datos de la muestra no sean válidos sino que destaca que la información no está disponible para todos los ensayos.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a 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: 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

Las muestras de NTC generan resultados positivos en el canal verde FAM

- | | |
|---|--|
| Se ha producido contaminación durante la preparación de la PCR. | Repita la PCR con 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 estén contaminados. |
|---|--|

Ausencia de señal en el control positivo para EGFR

- | | |
|--|--|
| 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 equipo Rotor-Gene Q MDx no es correcta. | Compare el perfil de temperatura con el protocolo. 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. |

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

Comentarios y sugerencias

- d) Las condiciones de almacenamiento de uno o varios componentes no siguen las instrucciones indicadas en el apartado "Almacenamiento y manipulación de reactivos" (página 15). 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.
- e) El kit *therascreen* 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.

Control de calidad

De acuerdo con el 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 los equipos Rotor-Gene Q MDx puede utilizar el producto.

El producto es para uso exclusivo en el termociclador para PCR en tiempo real de Rotor-Gene Q MDx.

Para obtener unos resultados óptimos, es preciso que siga detenidamente las instrucciones indicadas en el *manual de uso del kit* *therascreen* EGFR RGQ PCR. No se recomienda la dilución de reactivos distintos a los descritos en este manual. De lo contrario, el rendimiento se verá disminuido.

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 de control 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

Rendimiento analítico

Las características de rendimiento específicas del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se han determinado a partir de estudios realizados con muestras de tejido FFPE obtenidas de pacientes con NSCLC y líneas celulares humanas FFPE (líneas celulares FFPE). Las líneas celulares FFPE se han generado a partir de una línea celular de carcinoma de pulmón (A549) para producir líneas celulares que contengan las mutaciones de EGFR específica deseadas. Se ha utilizado ADN plasmídico cuando no se han podido conseguir muestras de tejidos o líneas celulares.

Límite de blanco (LOB), intervalo de funcionamiento y valores de corte

Se analizaron un total de 417 muestras de FFPE en un estudio que sigue los requerimientos de NCCLS EP17-A (2004) (12) para determinar el LOB y los valores de corte para cada ensayo de mutación. También se determinó el intervalo de funcionamiento. Los valores de corte se establecieron tal y como se indica en la tabla 9.

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

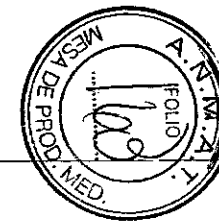


Tabla 9. Valores de corte establecidos para cada ensayo de mutación

Ensayo	Valor de corte (ΔC_T)
T790M	$\leq 7,40$
Deleciones	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$
L861Q	$\leq 8,90$
G719X	$\leq 8,90$
S768I	$\leq 8,90$
Inserciones	$\leq 8,00$

El intervalo de C_T de la reacción de control se estableció entre 23,70 y 31,10 de C_T .

Los valores de corte y los intervalos de funcionamiento del ensayo se verificaron mediante estándares y muestras de FFPE adicionales. Durante la verificación, se estudió la capacidad de los valores de corte para distinguir la mutación correcta en un fondo de ADN nativo mediante la valoración de cada ensayo con una concentración elevada de ADN genómico y ADN de mutación introducidos (consulte el apartado "Reactividad cruzada" en la página 52). También se estudió el impacto del nivel de ADN introducido sobre la mutación (consulte el apartado "Impacto del ADN introducido sobre los valores de ΔC_T " en la página 52).

Para valorar el rendimiento del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR en ausencia de molde y para garantizar que una muestra blanco o una muestra con ADN nativo no genere una señal analítica que pueda indicar una concentración baja de la mutación, se evaluaron muestras sin molde y ADN nativo de EGFR obtenido de NSCLC. Los resultados demuestran la ausencia de identificaciones positivas de mutación de muestras NTC y muestras nativas de FFPE.

Impacto del ADN introducido sobre los valores de ΔC_T

El nivel de ADN introducido se define como la cantidad total de ADN de EGFR amplificable de una muestra a partir de los valores de C_T obtenidos de la reacción de control. Para demostrar que el rendimiento del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se mantiene estable en todo el intervalo de valores de C_T de la reacción de control (23,70-31,10), se analizaron los 7 ensayos de mutación EGFR con una serie de diluciones 1:3 de 6 puntos (con ADN extraído de líneas celulares de FFPE). El valor de C_T diana para la dilución 1, para cada mutación, fue de 24,70 aproximadamente. La dilución final, con un valor de C_T de aproximadamente 32-33, estaba fuera del intervalo de C_T para la reacción de control. En resumen, los valores de ΔC_T medidos en los diferentes niveles de ADN introducido se mantuvieron coherentes en todo el intervalo de trabajo del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Reactividad cruzada

Se analizó ADN de EGFR nativo con un nivel de ADN introducido elevado con el objetivo de valorar la amplificación no específica. Los resultados demostraron que los valores de ΔC_T más bajos superaban los valores de corte establecidos, lo que indica la ausencia de amplificación no específica.

Se analizaron líneas celulares de FFPE con niveles de ADN introducido elevados con todas las muestras de reacción para valorar la posible reactividad cruzada. Los resultados demostraron que la reactividad cruzada entre reacciones para mutación no afectaba al ensayo. Todos los valores mínimos de ΔC_T fueron superiores a los respectivos valores de corte del ensayo para todas las muestras de ADN y mezclas de reacción no concordantes.

Exactitud: comparación con el método de referencia analítico

Se llevó a cabo un estudio que demostró la concordancia de la detección de mutaciones entre el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR y la secuenciación bidireccional de Sanger. En el estudio se analizaron 360 muestras de FFPE.

Se analizaron las muestras con resultados válidos tanto con Sanger como con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR para valorar el porcentaje de concordancia positiva (PCP), el porcentaje de concordancia negativa (PCN) y el porcentaje de concordancia global (PCG). En la tabla 10 se resumen estos porcentajes, junto con los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95% bilaterales.

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

Tabla 10. Análisis del grado de concordancia

Medición	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95%
Porcentaje de concordancia positiva	99,4% (157/158)	96,5-100,0%
Porcentaje de concordancia negativa	86,6% (175/202)	81,2-91,0%
Porcentaje de concordancia general	92,2% (332/360)	89,0-94,8%

Para los 28 resultados discordantes del porcentaje de concordancia global:

- 1 muestra (3,6%) resultó nativa (es decir, no se detectó mutación) según el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR pero generó resultados de mutación detectada mediante la secuenciación Sanger.
- 27 muestras (96,4%) resultaron positivas para la detección de mutaciones mediante el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR pero se identificaron como nativas mediante la secuenciación Sanger.

Valores del límite de detección (LOD)

Se realizó un estudio para determinar el LOD de cada una de las 29 mutaciones de EGFR. Se definió el LOD como la cantidad más baja de ADN mutado en un entorno de ADN nativo con la que una muestra mutada genera resultados positivos para la mutación en el 95% de los resultados de las pruebas (C₉₅).

Para determinar el LOD de cada mutación, se prepararon muestras con diferentes porcentajes de mutación con concentraciones altas y bajas de ADN introducido y se analizaron con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (tabla 11). El LOD de cada ensayo se calculó por regresión logística. Para comprobar el LOD, se analizaron muestras de mutación con el LOD determinado y se verificó la tasa de pruebas positivas.

Tabla 11. LOD establecido a partir de muestras clínicas de FFPE, líneas celulares de FFPE o plásmidos con niveles altos y bajos de ADN introducido

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base	LOD (% de mutación)	
				Bajo	Alto
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [‡]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [†]	7,75 [‡]
	G719C	6253	2155G>T	10,3 [†]	- [§]
19	Deleciones	12384	2237_2255>T	1,58 ⁻	0,49 ⁻
		12387	2239_2258>CA	4,91 [†]	1,48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16,87 [†]	12,47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3,24 [†]	1,65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4,24 [†]	1,41 [†]
		12678	2237_2251del15	0,55 ⁻	0,24 ⁻
		6218	2239_2247del9	8,47 [†]	- [§]
		12728	2236_2253del18	2,43 [†]	- [§]
		12367	2237_2254del18	2,72 [†]	- [§]
		6210	2240_2251del12	4,09 [†]	- [§]
		6220	2238_2255del18	2,70 [†]	0,82 [†]
		6223	2235_2249del15	6,40 [†]	1,63 [†]
		6225	2236_2250del15	2,80 [†]	1,42 [†]
6254	2239_2253del15	0,86 ⁻	0,47 ⁻		
6255	2239_2256del18	0,14 ⁻	0,05 ⁻		
12369	2240_2254del15	4,94 ⁻	1,56 ⁻		
12370	2240_2257del18	8,10 ⁻	2,08 ⁻		

* COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer: <http://cancer.sanger.ac.uk/>

- † Valores del LOD establecidos mediante plásmidos.
- ‡ Valores del LOD establecidos mediante líneas celulares.
- Valores del LOD establecidos mediante muestras clínicas.
- § No evaluado.

La tabla continúa en la página siguiente.

70651



MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA M.N. 9483
DE3 TECNOLAB S.A.

Tabla 11. Continuación

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Cambio de base	LOD (% de mutación)	
				Bajo	Alto
19	Delecciones	12382	2239_2248TTAAGA GAAG>C	0,25 ⁻	0,10 ⁻
		12383	2239_2251>C	4,58 ⁻	1,74 ⁻
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [‡]
	Inserciones	12376	2307_2308ins GCCAGCGTG	11,61 [‡]	- [§]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [‡]	1,31 [‡]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [‡]	0,65 [‡]
T790M	6240	2369C>T	9,72 [‡]	5,09 [‡]	
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [‡]	1,13 [‡]
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [‡]	0,66 [‡]

* COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer:
<http://cancer.sanger.ac.uk/>

[†] Valores del LOD establecidos mediante plásmidos.

[‡] Valores del LOD establecidos mediante líneas celulares.

⁻ Valores del LOD establecidos mediante muestras clínicas.

[§] No evaluado.

Interferencia

Efectos del tejido necrótico

Las muestras clínicas FFPE de NSCLC con un contenido de tejido necrótico de hasta el 50%, tanto para muestras nativas como positivas para la mutación EGFR, no interfirieron en los resultados de identificación del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Sustancias exógenas

Se analizaron las sustancias potencialmente interferentes presentes durante el proceso de extracción del ADN tanto en muestras mutadas como en muestras nativas con una concentración 10 x: cera de parafina, xileno, etanol y

proteínasa K. Los resultados demostraron que estas sustancias no interfirieron con los resultados de identificación del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Reproducibilidad

Reproducibilidad entre lotes

El sistema de análisis del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR utiliza 2 kits individuales: el kit QIAamp DNA FFPE Tissue (que equivale funcionalmente al kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue) para el aislamiento del ADN y el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR para la amplificación del ADN y la detección del estado de mutación del gen EGFR. Se demostró la reproducibilidad entre lotes y la intercambiabilidad a partir de 3 lotes del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue y 3 lotes del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. El porcentaje global de identificaciones correctas entre lotes fue del 97,8% (317/324) para el ensayo de mutación de EGFR y del 100% (379/379) para las muestras nativas.

Manipulación de las muestras

Se examinó la reproducibilidad del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue a partir de secciones obtenidas de 3 bloques de muestras FFPE, concretamente de una muestra de mutación de delección del exón 19 (2235-2249 del15), una muestra de mutación L858R del exón 21 y una muestra nativa. Se realizaron extracciones por duplicado en 3 centros para obtener cada muestra, que luego se analizaron en 3 días no consecutivos durante un periodo de 6 días, lo que supone un total de 18 puntos de datos por muestra. En cada centro, 2 operadores llevaron a cabo la pruebas con un lote del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (un lote por centro, 3 lotes en total) en combinación con el mismo lote de los reactivos del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR para los centros. Todos los resultados de las muestras mutadas y nativas resultaron válidos y generaron el resultado de identificación esperado (identificación positiva = 100%, 18/18 para cada muestra), lo que respalda las características de reproducibilidad y repetibilidad del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR en la fase preanalítica de aislamiento del ADN.

Precisión y reproducibilidad

Se estudió la precisión y la reproducibilidad del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR mediante el análisis de ADN extraído de muestras clínicas FFPE de NSCLC o líneas celulares de FFPE, representativas de los 7 ensayos de mutación del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. En el estudio también se incluyeron las muestras clínicas FFPE nativas de NSCLC (tabla 12).

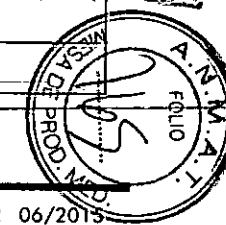
Se implementó un modelo de estudio matricial para valorar la reproducibilidad mediante el análisis de muestras en 3 laboratorios (centros), con 3 lotes del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (3 lotes en 3 centros), realizadas por 2 operadores en cada centro, en 2 equipos por centro. Cada muestra se analizó por duplicado (preparada con un nivel próximo al LOD) durante un total de 16 días. La reproducibilidad de cada mutación individual se llevó a cabo en días no consecutivos en cada centro. En la tabla 12 se muestra la proporción de identificaciones correctas.

Tabla 12. Reproducibilidad del ensayo: proporción de identificaciones correctas para las mutaciones de EGFR analizadas

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Identificaciones		% de identificaciones correctas IC del 95% unilateral inferior	
			Correctas/Totales	Corrección (%)		
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06	
19	Delecciones	12384	93/93	100	96,83	
		12387	92/92	100	96,8	
		12419	95/95	100	96,9	
		12422	83/83	100	96,46	
		13551	94/94	100	96,86	
		6220	96/96	100	96,93	
		6223	96/96	100	96,93	
		6225	95/95	100	96,9	
		6254	91/95	95,79	90,62	
		6255	92/92	100	96,8	
		12369	94/96	97,92	93,59	
		12370	95/95	100	96,9	
		12382	62/63	98,41	92,69	
12383	92/95	96,84	92,04			
20	S768I	6241	82/82	100	96,41	
		Inserciones	12378	93/93	100	96,83
			12377	92/92	100	96,8
T790M	6240	94/94	100	96,86		
21	L858R	6224	92/92	100	96,8	
	L861Q	6213	83/84	98,81	94,48	
	Nativa		84/84	100	96,5	

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

* COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en casos de cáncer:
<http://cancer.sanger.ac.uk/>



Se utilizó un análisis de los componentes de varianza para estimar la desviación estándar y los intervalos de confianza del 95% referentes a la variabilidad intraserial, entre series, entre días, entre lotes y entre centros. Para los componentes de la varianza, el coeficiente total de la variación (CV) fue $\leq 14,11\%$ para todas las mutaciones de EGFR analizadas. Para los miembros mutados del panel, el porcentaje de CV global fue $< 6\%$ entre lotes, entre días e intraserial. El porcentaje de CV para la variabilidad intraserial (repetibilidad/precisión) osciló entre el 5,99% y el 13,49%.

Rendimiento clínico

Datos de resultados clínicos

El ensayo clínico LUX-Lung 3 era un ensayo internacional, multicéntrico, abierto y aleatorizado de fase 3 sobre el afatinib como tratamiento primario frente a la quimioterapia para pacientes con adenocarcinoma pulmonar de fase IIIB o IV que presentan una mutación activadora del gen EGFR (número NCT00949650 de ClinicalTrials.gov). Se determinó la idoneidad de los pacientes para someterse al ensayo mediante el análisis del estado mutacional del gen EGFR del paciente con el ensayo de pruebas clínicas (CTA). Se realizaron pruebas retrospectivas de muestras de tejidos mediante el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Se realizó un estudio puente para evaluar la concordancia entre el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR y el CTA.

Según los resultados de la prueba del CTA, 345 pacientes formaban parte del conjunto aleatorizado (afatinib: 230 pacientes; quimioterapia: 115 pacientes). El resultado de eficacia principal fue un periodo de supervivencia sin progresión (SSP), según la valoración de un comité de revisión independiente (CRI). De entre los 345 pacientes aleatorizados, se analizaron retrospectivamente muestras tumorales de 264 pacientes (afatinib: 178 pacientes; quimioterapia: 86 pacientes) mediante el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Los resultados del CRI demostraron una mejora estadísticamente significativa de la SSP para los pacientes tratados aleatoriamente con afatinib, en comparación con los tratados aleatoriamente con quimioterapia, respecto a la población global positiva para CTA y la población positiva tanto para el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR como para CTA. Los resultados de la eficacia global se resumen en la tabla 13 y en la ilustración 19.

Tabla 13. Ventajas clínicas de los pacientes sometidos a análisis con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR en la población del ensayo clínico LUX-Lung 3

Parámetro	Población positiva para kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR/CTA n = 264		Población positiva para CTA n = 345	
	Quimioterapia n = 86	Afatinib n = 178	Quimioterapia n = 115	Afatinib n = 230
Supervivencia sin progresión (SSP)				
Número de muertes o progresiones, N (%)	53 (61,6%)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
SSP media (meses)	6,9	11,2	6,9	11,1
IC del 95% de la SSP media	[5,3; 8,2]	[9,7; 13,7]	[5,4; 8,2]	[9,6; 13,6]
Cociente de riesgo	0,49		0,58	
IC del 95% del cociente de riesgo	[0,35; 0,69]		[0,43; 0,78]	
Valor P (prueba de rango logarítmico estratificada)*	< 0,0001		< 0,001	

* Estratificado por raza y estado mutacional del EGFR

MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA M.N. 8483
DT - TECNOLAB S.A.

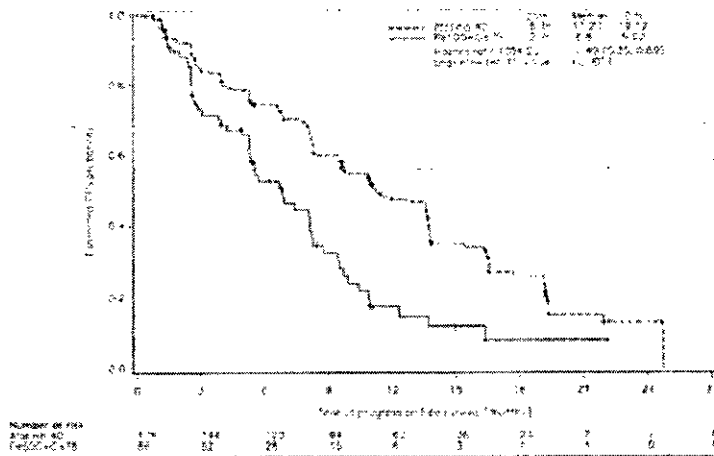


Ilustración 19. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia sin progresión (SSP) realizada por un comité de revisión independiente por cada grupo de tratamiento (población positiva para el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR/CTA)

El análisis del subconjunto de positivos para el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR/CTA (n = 264) reveló que los pacientes tratados con afatinib habían experimentado un aumento significativo en el tiempo de SSP (SSP media de 11,2 frente a 6,9 meses) y presentaban menos probabilidades de sufrir un evento de progresión de la enfermedad o de morir (CR = 0,49; IC del 95% [0,35; 0,69]; p < 0,0001) que los pacientes tratados con quimioterapia. La ventaja clínica observada en el subconjunto de pacientes sometidos a análisis con el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR era comparable a la observada en la población total del estudio (n = 345).

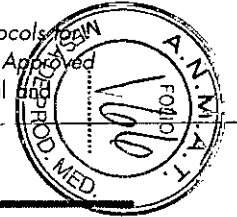
Referencias

Referencias bibliográficas

1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **65**, 7525.
3. Inoue, A., Suzuki, T., Fukuhara, T., Maemondo, M., and Kimura, Y. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive













- patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3340.
4. Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2-6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* **24** (18S) (Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2-6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* **24** (18S) (Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May-3 June 2008. *J. Clin. Oncol.* **26** (15S) (Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2442.
8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl), abstr 8038.
9. Jaene, P.A. and Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutation on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. rd Cambridge Con on Novel Agents in the Treatment of Lung Cancer: Advances in EGFR-Targeted Agents, Cambridge, 23-24 Sep 2005. *Clin. Cancer Res.* **12** (Suppl.14), 4416.
10. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech* **17**, 804.
11. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline*; 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

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



Símbolos

Los símbolos siguientes pueden aparecer en el embalaje y las etiquetas:

	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de referencia
	Número de lote
	Número de material
	Mantener alejado de la luz solar
	Número mundial de artículo comercial
Rn	"R" significa revisión del manual y "n" es el número de revisión
	Limitación de temperatura
	Fabricante
	Consultar las instrucciones de uso
	Precaución

Apéndice A: protocolo manual del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

Este apartado contiene instrucciones para utilizar el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR con el software Rotor-Gene Q versión 2.3 en modo abierto (es decir, sin utilizar el software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Información general

- Para obtener una lista de los materiales necesarios, consulte el apartado "Materiales requeridos pero no suministrados", en la página 12.
- Para obtener instrucciones sobre la preparación y la disposición de las muestras, consulte los apartados "Protocolo: valoración de las muestras", en la página 18, y "Protocolo: detección de mutaciones de EGFR", en la página 29.
- Asegúrese de que los parámetros de ciclo son correctos antes de iniciar cada serie.

Protocolo: creación de un perfil de temperatura

Antes de empezar, cree un perfil de temperatura para el análisis del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Los parámetros de ciclado son los mismos para la valoración de muestras de ADN y la detección de mutaciones de EGFR.

Procedimiento

En la tabla 14 se resumen los parámetros de ciclado.

Tabla 14. Perfil de temperatura

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

1. Haga doble clic en el icono del software Rotor-Gene Q, versión 2.3, situado en el escritorio del PC conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx.
2. 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).

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

3. 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 20).

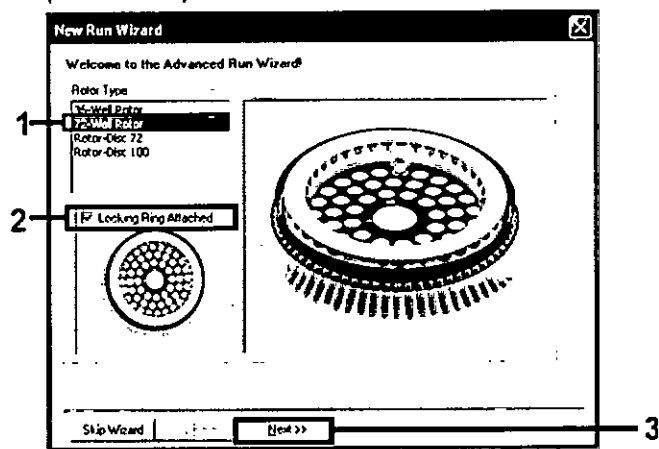


Ilustración 20. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) (1 = "Rotor Type" [Tipo de rotor], 2 = Casilla "Locking Ring Attached" [Anillo de fijación sujeto], 3 = Botón "Next" [Siguiente])

4. 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 21).

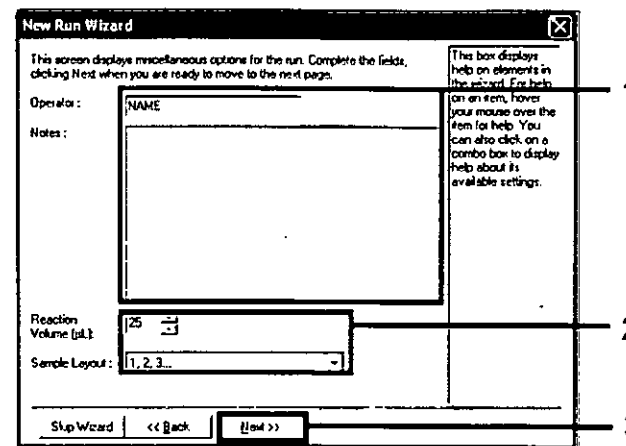


Ilustración 21. Introducción del nombre del usuario y los volúmenes de reacción (1 = Campo "Operator" y campo "Notes" [Notas], 2 = Campo "Reaction Volume" [Volumen de reacción] y campo "Sample Layout" [Disposición de muestras], 3 = Botón "Next" [Siguiente])

5. Haga clic en "Edit Profile" (Editar perfil) situado en el cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) (ilustración 22) y revise los parámetros de la serie analítica según los pasos siguientes.

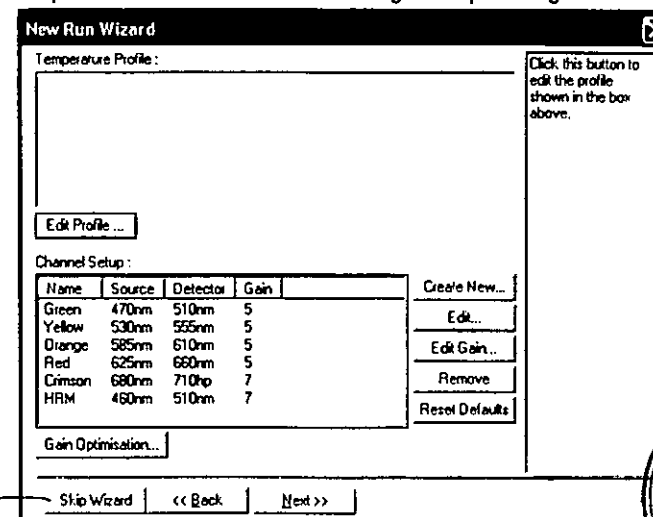
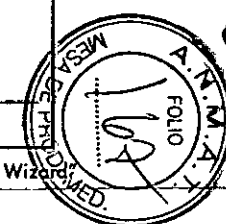


Ilustración 22. "Edit Profile" (Editar perfil) en el cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas)

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



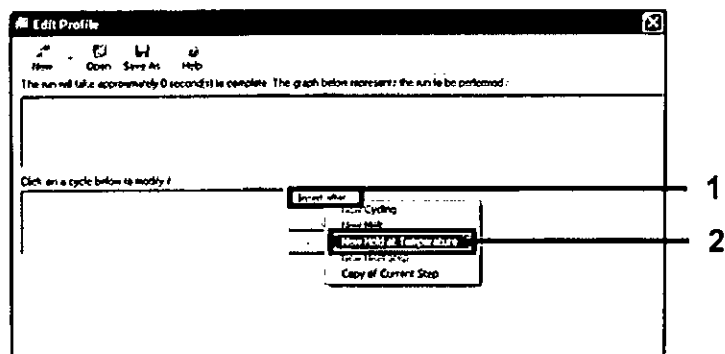


Ilustración 23. Inserción de un paso de incubación inicial (1 = Botón "Insert after" (Insertar después), 2 = "New Hold at Temperature" (Nueva fase de temperatura))

6. Haga clic en el botón "Insert after" (Insertar después) y seleccione "New Hold at Temperature" (Nueva fase de temperatura) (ilustración 23).
7. Cambie el valor de "Hold Temperature" (Mantener temperatura) a 95 °C y "Hold Time" (Mantener tiempo) en "15 mins 0 secs" (15 min 0 s). Haga clic en "Insert After" (Insertar después) y seleccione "New Cycling" (Ciclos nuevos) (ilustración 24).

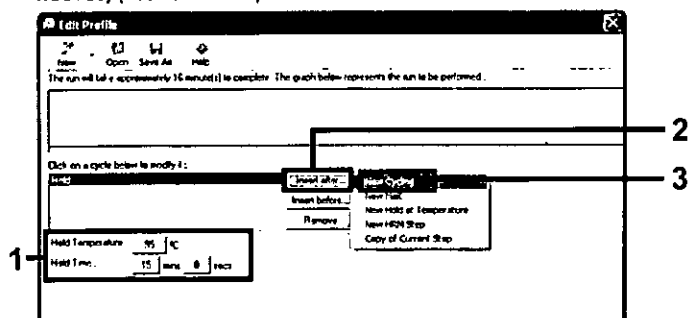


Ilustración 24. Paso de incubación inicial a 95 °C (1 = Botones "Hold Temperature" (Mantener temperatura) y "Hold Time" (Mantener tiempo), 2 = Botón "Insert after" (Insertar después), 3 = "New Cycling" (Ciclos nuevos))

8. 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 25).

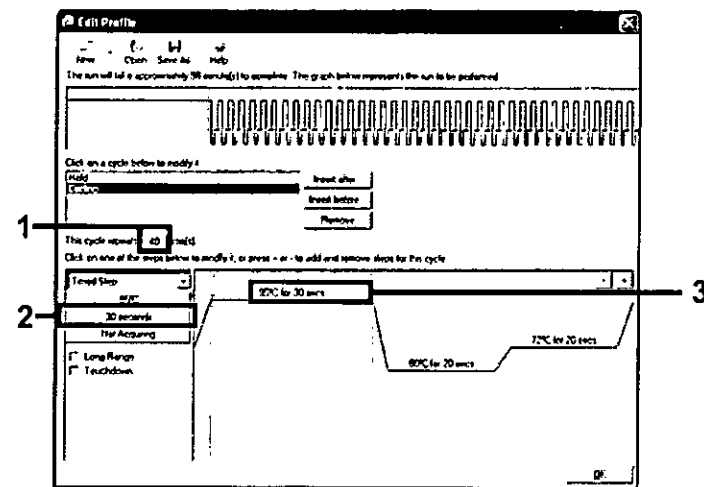


Ilustración 25. Paso de ciclado a 95 °C (1 = Casilla de repeticiones de ciclo, 2 = Ajuste de temperatura de primer paso, 3 = Ajuste de tiempo de primer paso)

9. 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 paso, seleccione el botón "Not Acquiring" (No adquirir) (ilustración 26).

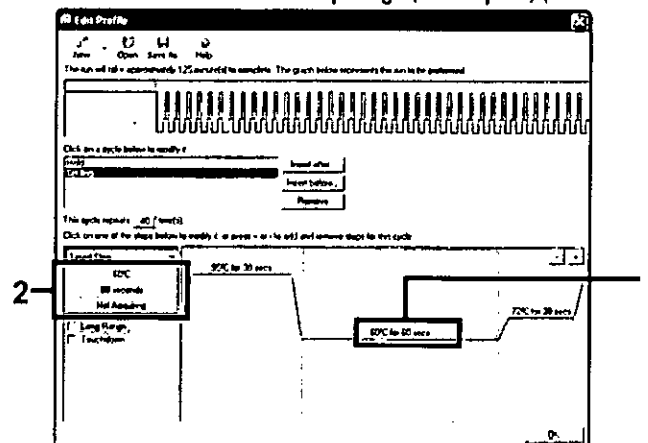


Ilustración 26. Paso de ciclado a 60 °C (1 = Ajuste de temperatura y tiempo de segundo paso, 2 = Botón "Not Acquiring" (No adquirir))

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

10. Establezca "Green" (Verde) y "Yellow" (Amarillo) como canales de obtención. Para ello, seleccione el botón ">" para transferir estos canales de la lista "Available Channels" (Canales disponibles). Haga clic en "OK" (Aceptar) (ilustración 27).

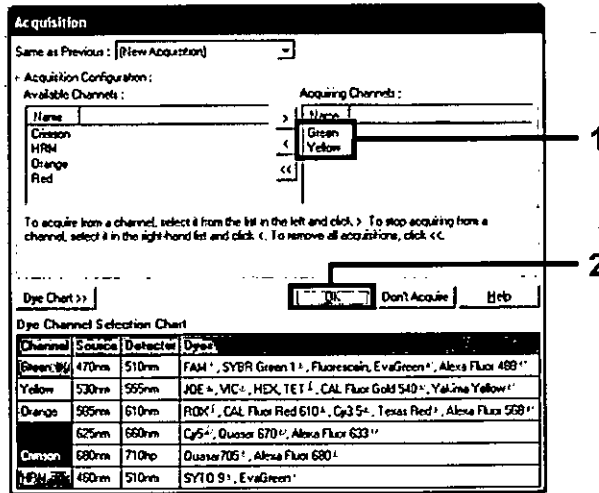


Ilustración 27. Adquisición en el paso de ciclado a 60 °C (1 = Canales seleccionados, 2 = Botón "OK" (Aceptar))

11. Seleccione el tercer paso y elimínelo mediante el botón "-". Haga clic en "OK" (Aceptar) (ilustración 28).

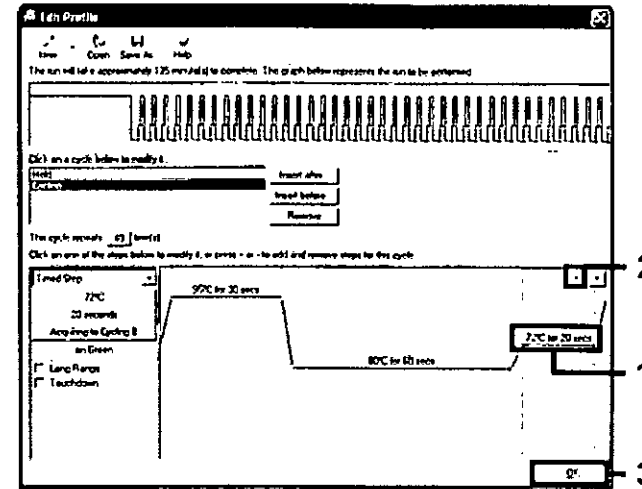


Ilustración 28. Eliminación del paso de extensión (1 = Tercer paso, 2 = Botón para eliminar, 3 = Botón "OK" (Aceptar))

12. En el cuadro de diálogo siguiente, haga clic en "Gain Optimisation" (Optimización de ganancia) (ilustración 29).

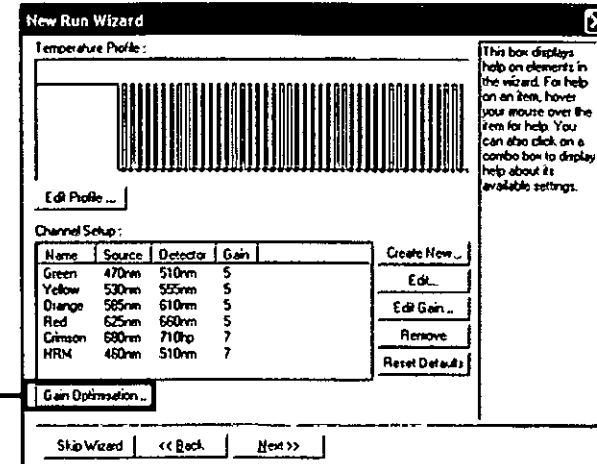


Ilustración 29. Optimización de la ganancia (1)

MARTSOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N: 9483
DT - TECNOLAB S.A.



7065

13. Haga clic en el botón "Optimise Acquiring" (Optimizar adquisición). Para cada canal, se muestra la configuración de canal. Acepte los valores predeterminados haciendo clic en "OK" (Aceptar) para ambos canales (ilustración 30).

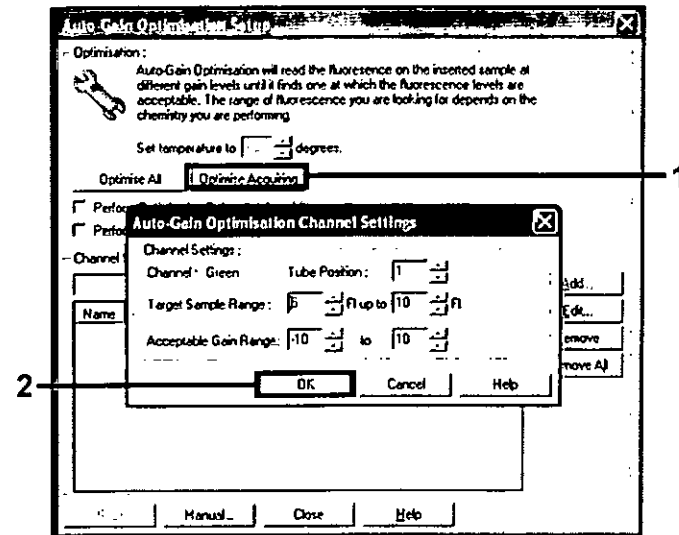


Ilustración 30. Optimización de la ganancia automática para el canal verde (1 = Botón "Optimise Acquiring" [Optimizar adquisición], 2 = Botón "OK" [Aceptar])

14. 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 31).

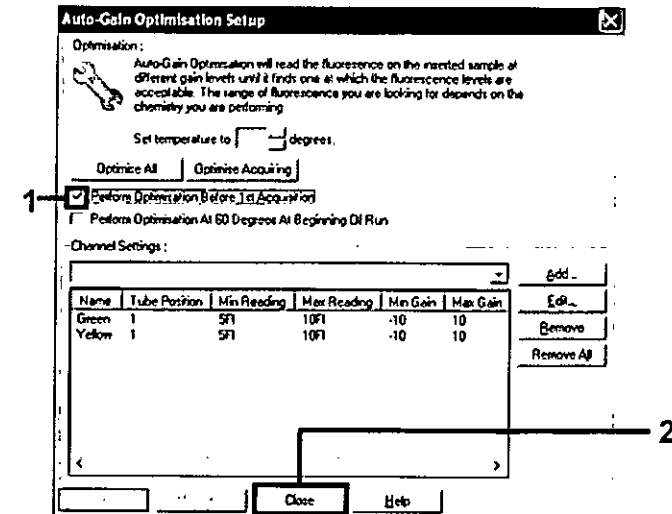


Ilustración 31. Selección de los canales verde y amarillo (1 = Casilla de verificación "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" [Ejecutar la optimización antes de la primera adquisición], 2 = Botón "Close" [Cerrar])

15. Haga clic en "Next" (Siguiente) (ilustración 32) para guardar el molde del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (archivo *.ret) en una ubicación adecuada. Para ello, seleccione "Save Template" (Guardar molde).

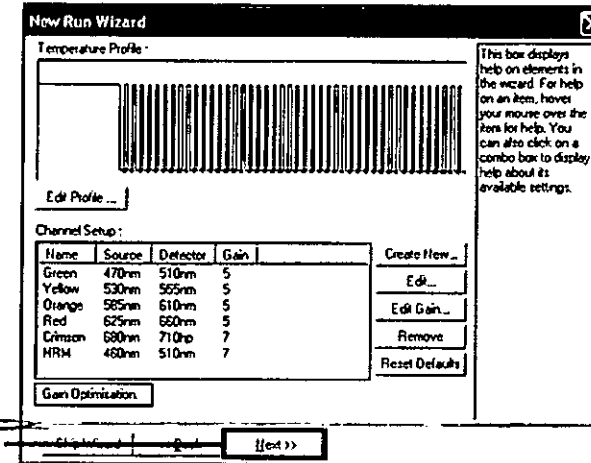


Ilustración 32. Botón "Next" (Siguiente) (1)

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

Procedimiento (manual)

Protocolo: valoración de las muestras (manual)

Este protocolo se utiliza para valorar el ADN total amplificable de las muestras y debería aplicarse antes de realizar el análisis de mutación de EGFR.

- Prepare las muestras tal como se describe en el apartado "Protocolo: valoración de las muestras", en la página 18, hasta el paso 11.
- Configure la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx tal como se describe en el apartado "Protocolo: configuración del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR con el software Rotor-Gene Q", en la página 74.
- Una vez finalizada la serie, analice los datos según las instrucciones del apartado "Análisis de los datos de valoración de las muestras", en la página 79.

Protocolo: detección de mutaciones de EGFR (manual)

Cuando una muestra es correcta según la evaluación de muestras, se puede analizar para detectar mutaciones de EGFR.

- Prepare las muestras tal como se describe en el apartado "Protocolo: detección de mutaciones de EGFR", en la página 29, hasta el paso 11.
- Configure la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx tal como se describe en el apartado "Protocolo: configuración del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR con el software Rotor-Gene Q", en la página 74.
- Una vez finalizada la serie, analice los datos según las instrucciones del apartado "Análisis de los datos de la detección de mutaciones del gen EGFR", en la página 80.

Protocolo: configuración del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR con el software Rotor-Gene Q

Procedimiento

1. Abra el software Rotor-Gene Q versión 2.3 y el perfil de temperatura adecuado del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (archivo *.ret).

Para obtener instrucciones sobre la creación del perfil de temperatura y la comprobación de los parámetros de la serie analítica, consulte el apartado "Protocolo: creación de un perfil de temperatura", en la página 64.

2. Asegúrese de seleccionar el rotor correcto y marque la casilla para confirmar que el anillo de fijación esté sujeto. Haga clic en "Next" (Siguiete) (ilustración 33).

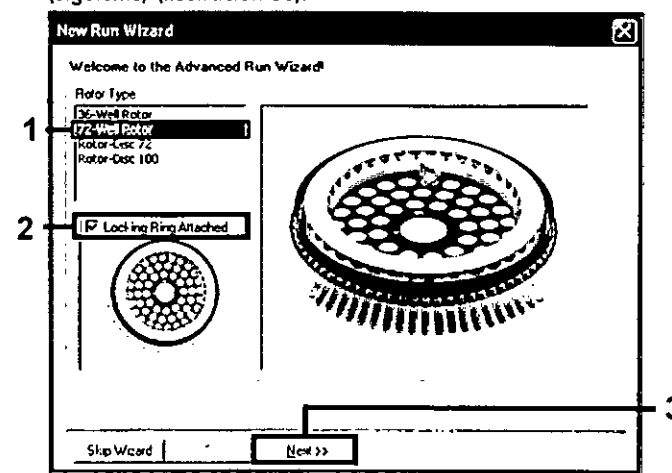
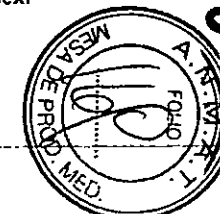


Ilustración 33. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) y pantalla de inicio (1 = "Rotor Type" [Tipo de rotor], 2 = Casilla "Locking Ring Attached" [Anillo de fijación sujeto], 3 = Botón "Next" [Siguiete])

3. Introduzca el nombre del usuario. Añada las notas que desee y compruebe que el volumen de reacción esté configurado en 25 y que "Sample Layout" (Disposición de muestras) indique "1, 2, 3...". Haga clic en "Next" (Siguiete) (ilustración 34).

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



70651

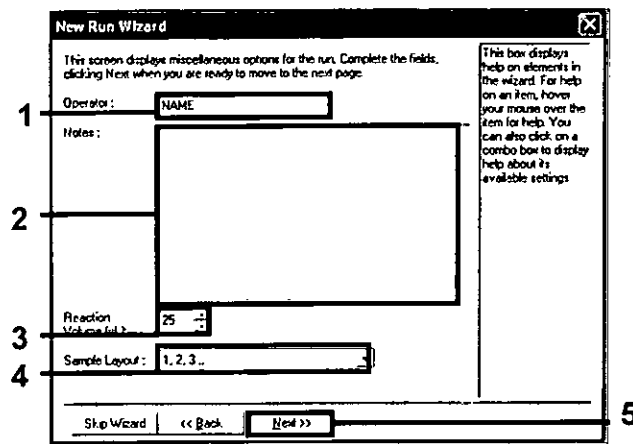


Ilustración 34. Pantalla de opciones "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) (1 = "Operator" [Operador], 2 = Campo "Notes" [Notas], 3 = "Reaction Volume" [Volumen de reacción], 4 = Campo "Sample Layout" [Disposición de muestras], 5 = Botón "Next" [Siguiente])

- La siguiente ventana permite editar el perfil de temperatura. No es necesario editar, porque el perfil de temperatura se creó según las instrucciones del apartado "Protocolo: creación de un perfil de temperatura", en la página 64. Haga clic en "Next" (Siguiente) (ilustración 35).

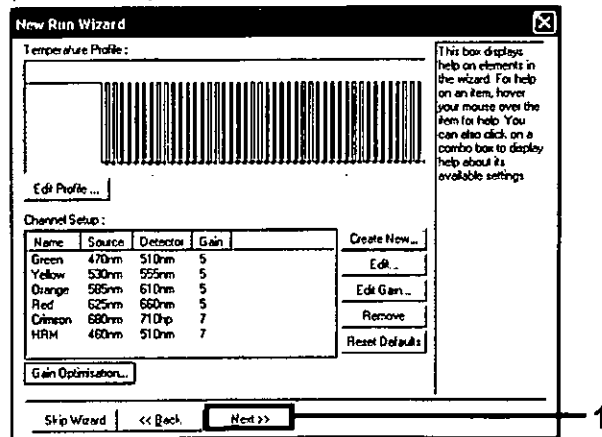


Ilustración 35. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) y pantalla de edición de temperatura (1 = Botón "Next" [Siguiente])

- Compruebe el resumen y haga clic en "Start Run" (Iniciar la serie) para guardar el archivo de análisis y comenzar la serie (ilustración 36).

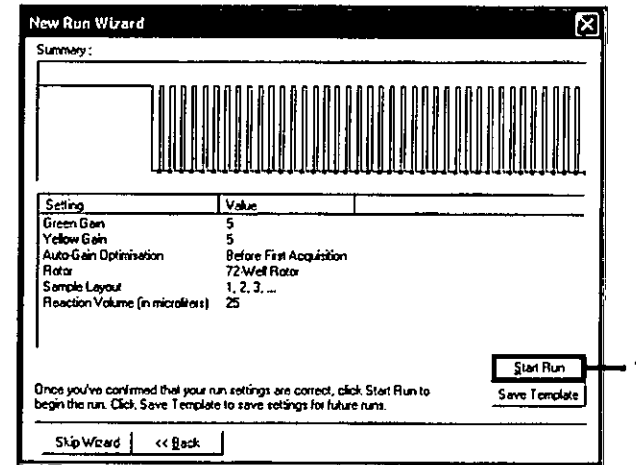


Ilustración 36. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) y pantalla de resumen (1 = Botón "Start Run" [Iniciar la serie])

- Una vez iniciada la serie, aparece una nueva ventana. 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.

Al hacer clic en "Finish and Lock Samples" (Finalizar y bloquear muestras) se evita la edición de los nombres de las muestras. El usuario debe extremar la precaución al introducir los nombres de las muestras para asegurarse de realizar correctamente las pruebas y los análisis de las muestras.

Nota: al introducir el nombre de las muestras, los campos para tubos vacíos deben dejarse en blanco en la columna "Name" (Nombre).

- Una vez finalizada la serie, analice los datos según los apartados "Análisis de los datos de valoración de las muestras", en la página 79, o "Análisis de los datos de la detección de mutaciones del gen EGFR", en la página 80, como corresponda.

- Si necesita crear informes de cuantificación, haga clic en el icono "Reports" (Informes) situado en la barra de herramientas del archivo de la serie analítica Rotor-Gene Q.

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

9. En el explorador de informes, haga clic en "Cycling A. Green (Page 1)" (Ciclado A. Verde [página 1]) en "Report Categories" (Categorías de informes) (ilustración 37).

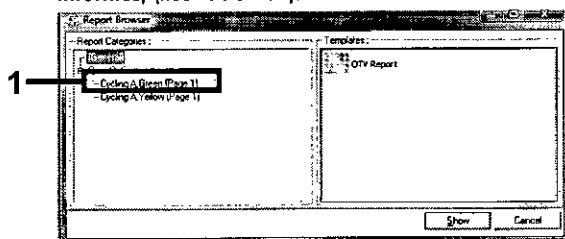


Ilustración 37. Explorador de informes (1 = Botón "Cycling A. Green (Page 1)" [Ciclado A. Verde (página 1)])

10. Seleccione "Quantitation (Full Report)" (Cuantificación [Informe completo]) en "Templates" (Moldes) (ilustración 38).

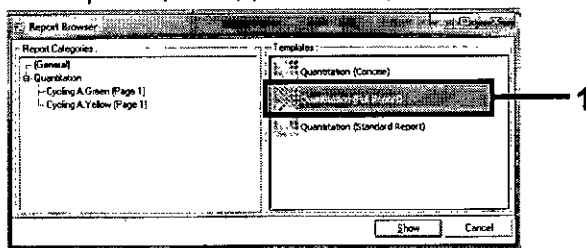


Ilustración 38. Informe de cuantificación (informe completo) (1)

11. Haga clic en "Show" (Mostrar) para generar el informe.
 12. Haga clic en "Save As" (Guardar como) para guardar una versión electrónica.
 13. Repita el procedimiento para "Cycling A. Yellow (Page 1)" (Ciclado A. Amarillo [página 1]).

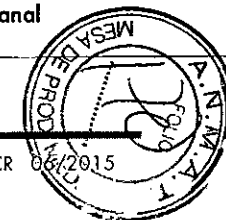
Interpretación de los resultados (manual)

Una vez finalizada la serie del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (para la valoración de muestras de ADN o el análisis de mutaciones de EGFR), analice los datos conforme a los procedimientos que se indican a continuación:

- Configuración del software para el análisis
- Análisis para la valoración de muestras de ADN (manual)
Nota: consulte la tabla 4, en la página 21, para conocer el esquema de tubos.
- Análisis para la detección de mutaciones de EGFR (manual)
Nota: consulte la tabla 7, en la página 32, para conocer el esquema de tubos.

Configuración del análisis del software

1. Utilice el software Rotor-Gene Q versión 2.3 para abrir el archivo de serie analítica (*.rex) adecuado.
2. Si no se ha introducido el nombre de las muestras antes de realizar la serie, haga clic en "Edit Samples" (Editar muestras).
3. Introduzca los nombres de las muestras en la columna "Name" (Nombre).
Nota: deje en blanco los nombres de los tubos vacíos.
4. Haga clic en "Analysis" (Análisis). En la página de análisis, haga clic en "Cycling A. Yellow" (Ciclado A. Amarillo) para comprobar el canal amarillo (HEX).
5. Haga clic en "Named On" (Con nombre).
Nota: esto permite asegurarse de que los tubos vacíos no se incluyen en el análisis.
6. Seleccione "Dynamic tube" (Tubo dinámico).
7. Seleccione "Slope Correct" (Pendiente correcta).
8. Seleccione "Linear scale" (Escala lineal).
9. Seleccione "Take off Adj." (Aj. de inicio) e introduzca los valores 15,01 en la casilla superior ["If take off point was calculated before cycle" (Si el punto de inicio se calculó antes que el ciclo)] y 20,01 en la casilla inferior ["then use the following cycle and take off point" (utilice el ciclo y el punto de inicio siguientes)].
10. Configure el umbral en 0,02 y compruebe los valores de C_T del canal amarillo (HEX).



11. En la página de análisis, haga clic en "Cycling A. Green" (Ciclado A. Verde) para ver el canal verde (FAM).
12. Seleccione "Named On" (Con nombre).
13. Seleccione "Dynamic tube" (Tubo dinámico).
14. Seleccione "Slope Correct" (Pendiente correcta).
15. Seleccione "Linear scale" (Escala lineal).
16. Seleccione "Take off Adj." (Aj. de inicio) e introduzca los valores 15,01 en la casilla superior ("If take off point was calculated before cycle" [Si el punto de inicio se calculó antes que el ciclo]) y 20,01 en la casilla inferior ("then use the following cycle and take off point" [utilice el ciclo y el punto de inicio siguientes]).
17. Configure el umbral en 0,075 y compruebe los valores de C_T del canal verde (FAM).

Análisis de los datos de valoración de las muestras

Una vez finalizada la serie de valoración de muestras de ADN, consulte el apartado "Configuración del análisis del software", en la página 78, y analice los datos tal como se indica a continuación. Consulte la tabla 4, en la página 21, para conocer el esquema de tubos.

Análisis de control de la serie

Control negativo

Para garantizar que el molde no está contaminado, el NTC no debe generar un valor de C_T inferior a 40 en el canal verde (FAM).

Para garantizar que la serie está configurada correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación dentro del intervalo de 29,85 a 35,84 en el canal amarillo (HEX). Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos).

Control positivo

El control positivo (PC) de EGFR debe generar un valor de C_T en el canal verde (FAM) dentro del intervalo de 28,13 a 34,59. La aparición de un valor fuera de este intervalo indica un problema de configuración del ensayo. La serie ha generado un error.

Nota: no deben utilizarse los datos de las muestras si ha fallado el control negativo o positivo.

Análisis de la muestra

Si los controles de la serie de valoración de muestras de ADN son válidos, se puede continuar con el análisis. El valor de C_T de control de una muestra debe encontrarse dentro del intervalo 23,70-31,10 del canal verde (FAM). Si el valor de C_T de la muestra se encuentra fuera de este intervalo, proceda como se indica a continuación para cada caso.

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra < 23,70

Las muestras con un valor de C_T de control < 23,70 (concentración elevada de ADN) sobrecargarán los ensayos de mutación, por lo que deben diluirse. Para detectar cada mutación a un nivel bajo, se diluyen las muestras sobreconcentradas para que queden comprendidas en el intervalo de C_T de 23,70 a 31,10. Al diluir el ADN de la muestra, aumenta el C_T (una dilución 1:1 aumenta el valor de C_T en aproximadamente 1,0). Diluya las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para la dilución [Dil:]).

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra > 31,10

Se recomienda volver a extraer las muestras con un C_T de control > 31,10 en el canal verde (FAM). El ADN molde inicial presente no es suficiente para detectar todas las mutaciones de EGFR con los valores de corte indicados para el ensayo.

Análisis de los datos de la detección de mutaciones del gen EGFR

Una muestra debe ser correcta según la valoración de muestras de ADN para poder analizarla y detectar mutaciones de EGFR (consulte el apartado "Análisis de los datos de valoración de las muestras", en la página 79).

Una vez finalizada la serie de detección de mutaciones de EGFR, consulte el apartado "Configuración del análisis del software", en la página 78, y analice los datos tal como se indica a continuación. Consulte la tabla 7, en la página 32, para conocer el esquema de tubos.

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

Análisis de control de la serie

Consulte el organigrama del análisis de control de la serie en la ilustración 39.

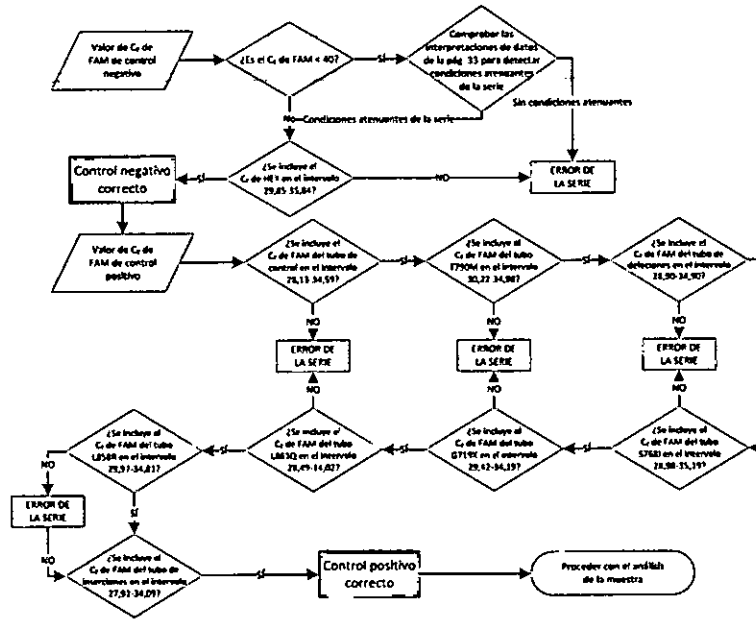


Ilustración 39. Organigrama del análisis de control de la serie para la detección de mutaciones de EGFR

Control negativo

Para garantizar que el molde no está contaminado, el NTC de cada ensayo de mutación de EGFR no debe generar un valor de C_T inferior a 40 en el canal verde (FAM).

Para garantizar que la serie está configurada correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación dentro del intervalo de 29,85 a 35,84 en el canal amarillo (HEX). Los valores especificados son los comprendidos entre estos valores (ambos incluidos).

Control positivo

En cada ensayo de mutación de EGFR, el control positivo (PC) de EGFR debe generar un valor de C_T en el canal verde (FAM) dentro del intervalo como se indica en la tabla 15. La aparición de un valor fuera de este intervalo indica un problema de configuración del ensayo. La serie ha generado un error.

Nota: no deben utilizarse los datos de las muestras si el control de análisis negativo o positivo da error.

Tabla 15. Intervalos de C_T aceptables para los controles positivos de reacción (ensayo de detección de mutaciones de EGFR)

Mezcla de reacción	Muestra	Canal	Intervalo de C_T
Control	PC	Verde	28,13-34,59
T790M	PC	Verde	30,22-34,98
Deleciones	PC	Verde	28,90-34,90
L858R	PC	Verde	29,97-34,81
L861Q	PC	Verde	28,49-34,02
G719X	PC	Verde	29,42-34,19
S768I	PC	Verde	28,98-35,19
Inserciones	PC	Verde	27,92-34,09

Análisis de la muestra – Valor de C_T del canal verde (FAM) para el control de la muestra

Si los controles positivo y negativo de la serie de detección de mutaciones de EGFR son válidos, se puede continuar con la detección de mutaciones de EGFR en las muestras.

El valor de C_T de control para una muestra en el canal verde (FAM) debe figurar en el intervalo de 23,70 a 31,10. Consulte la tabla 7, en la página 32, para conocer el esquema de tubos.

Si el valor de C_T de control para la muestra se encuentra fuera de este intervalo, proceda como se indica a continuación para cada caso.

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra < 23,70

Las muestras con un valor de C_T de control < 23,70 (concentración elevada de ADN) sobrecargarán los ensayos de mutación, por lo que deben diluirse.

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



Para detectar cada mutación a un nivel bajo, se diluyen las muestras sobreconcentradas para que queden comprendidas en el intervalo de C_T de 23,70 a 31,10. Al diluir el ADN de la muestra, aumenta el C_T (una dilución 1:1 aumenta el valor de C_T en aproximadamente 1,0). Diluya las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para la dilución [Dil.]).

- Valor de C_T del ensayo de control de la muestra > 31,10

Se recomienda volver a extraer las muestras con un C_T de control > 31,10 en el canal verde (FAM). El ADN molde inicial presente no es suficiente para detectar todas las mutaciones de EGFR con los valores de corte indicados para el ensayo.

Consulte el organigrama del análisis de la muestra para la detección de mutaciones de EGFR en la ilustración 40.

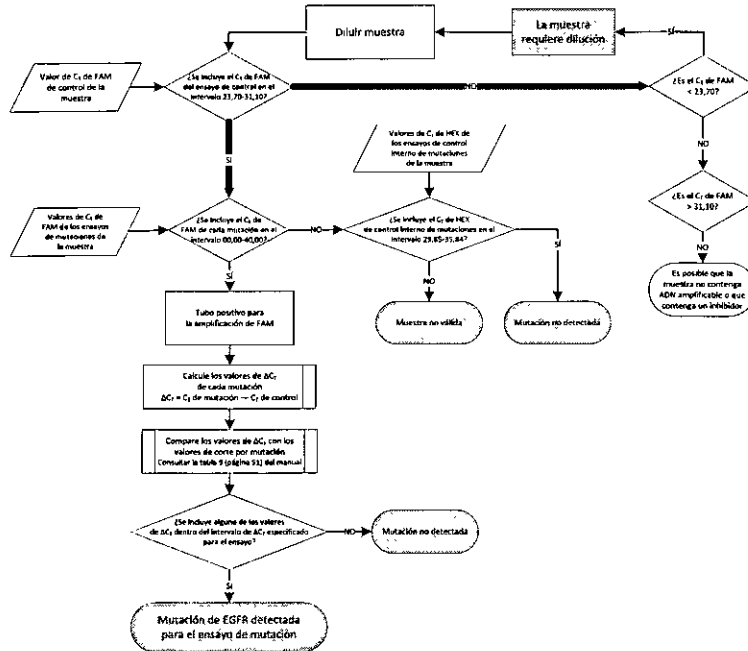


Ilustración 40. Organigrama del análisis de la muestra de la serie para la detección de mutaciones de EGFR

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

Análisis de la muestra — Valor de C_T del canal amarillo (HEX) del control interno de la muestra

Consulte el organigrama del análisis de la muestra para la detección de mutaciones de EGFR en la ilustración 40.

Es necesario analizar todos los tubos de cada muestra. Compruebe que cada tubo genere una señal HEX comprendida en el intervalo de 29,85 a 35,84 del control interno en el canal amarillo (HEX). Existen 2 resultados posibles.

- Si el C_T del control interno se incluye dentro del intervalo especificado (de 29,85 a 35,84), el resultado es positivo para la amplificación de canal amarillo (HEX).

La amplificación de canal amarillo (HEX) de ese tubo es válida.

- Si el C_T del control interno está por encima del intervalo especificado (> 35,84), el resultado es negativo para la amplificación de canal amarillo (HEX).

Si existe amplificación en el canal verde (FAM) para ese tubo, la amplificación del canal amarillo (HEX) es válida. Si no existe amplificación en el canal verde (FAM) para el tubo, la amplificación del canal amarillo (HEX) no es válida.

La amplificación del control interno en el canal amarillo (HEX) puede generar un error provocado por una inhibición de la PCR. Si se diluye la muestra, se pueden reducir los efectos de los inhibidores. Cabe destacar que esta acción también diluye el ADN diana de la muestra. Diluya las muestras con el agua suministrada con el kit (agua para la dilución [Dil.]).

Análisis de la muestra — Valor de C_T del canal verde (FAM) de los ensayos de mutaciones de la muestra

Es necesario comparar los valores del canal verde (FAM) de las 7 mezclas para reacción de mutación de EGFR con los valores de la tabla 16. Los valores especificados son los comprendidos entre los valores mostrados (que también se incluyen). Consulte la tabla 7, en la página 32, para conocer el esquema de tubos.

Tabla 16. Valores aceptables para las reacciones de mutaciones de EGFR de las muestras en el canal verde (FAM) (ensayo de detección de mutaciones de EGFR)

Ensayo	Intervalo de C_T	Valor de corte (ΔC_T)
T790M	0,00-40,00	$\leq 7,40$
Deleciones	0,00-40,00	$\leq 8,00$
L858R	0,00-40,00	$\leq 8,90$
L861Q	0,00-40,00	$\leq 8,90$
G719X	0,00-40,00	$\leq 8,90$
S768I	0,00-40,00	$\leq 8,90$
Inserciones	0,00-40,00	$\leq 8,00$

- Si el C_T del canal verde (FAM) de la muestra se incluye dentro del intervalo especificado, la amplificación del canal verde es positiva.
- Si el C_T del canal verde (FAM) de la muestra está por encima del intervalo especificado o si no existe amplificación, la amplificación de FAM es negativa.

Calcule el valor de ΔC_T de todos los tubos de detección de mutaciones de EGFR que presenten amplificación de FAM 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. Consulte la tabla 7, en la página 32, para conocer el esquema de tubos.

$$\Delta C_T = [\text{valor de } C_T \text{ del ensayo de mutación}] - [\text{valor de } C_T \text{ del ensayo de control}]$$

Compare el valor de ΔC_T de la muestra con el punto de corte del ensayo en cuestión (tabla 16). Asegúrese de que se aplica el punto de corte correcto.

El punto de corte es el punto a partir del que una señal positiva de un ensayo podría ser la respuesta a una señal de fondo del primer ARMS en ADN nativo. Si el valor de ΔC_T de la muestra es superior al punto de corte de un ensayo, ésta se considera negativa o fuera de los límites de detección del kit de dicho ensayo.

El estado de las reacciones de mutación de cada muestra puede ser uno de los siguientes:

- Mutación detectada
- Mutación no detectada
- No válida

Mutación detectada

La amplificación del canal verde (FAM) es positiva y el valor de ΔC_T es igual, o inferior, al valor de corte. Si se detectan varias mutaciones para una muestra, pueden notificarse todas.

Mutación no detectada

La amplificación del canal verde (FAM) es positiva y el valor de ΔC_T está por encima del valor de corte.

La amplificación del canal verde (FAM) es negativa y la amplificación del canal amarillo (HEX, control interno) es positiva.

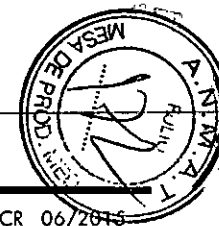
No válida

La amplificación del canal amarillo (HEX, control interno) no es válida.

La amplificación del canal verde (FAM) es negativa y la amplificación del canal amarillo (HEX, control interno) es negativa.

Nota: una muestra puede ser negativa para la amplificación del canal amarillo (HEX) en un tubo, pero positiva para la amplificación del canal verde (FAM) en un segundo tubo. En este caso, un resultado "Mutation detected" (Mutación detectada) en un segundo tubo se puede considerar válido, si bien la mutación específica identificada podría no ser la única presente en la muestra.

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



Apéndice B: instalación del software *therascreen* EGFR CE Assay Package

El kit *therascreen* EGFR RGQ PCR se ha diseñado para su uso con el equipo Rotor-Gene Q MDx y con un rotor de 72 pocillos. El software *therascreen* EGFR CE Assay Package se encuentra disponible por separado en CD (referencia 9023537). El paquete de ensayo incluye "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" y "therascreen EGFR CE Locked Template".

Nota: el software *therascreen* EGFR CE Assay Package solamente es compatible con el software Rotor-Gene Q, versión 2.3. Compruebe que se haya instalado la versión correcta del software Rotor-Gene Q antes de proceder a instalar *therascreen* EGFR CE Assay Package. Si utiliza un equipo Rotor-Gene Q MDx con una versión de software anterior, actualícela descargándose la versión 2.3 del software Rotor-Gene Q de la página de producto de Rotor-Gene Q MDx, en el apartado "Product Resources" (Recursos de producto) de la pestaña "Operating Software" (Software operativo) en www.qiagen.com/p/rgq-mdx.

Procedimiento

1. Solicite el CD *therascreen* EGFR CE Assay Package (referencia 9023537).
2. Introduzca el CD en la unidad correspondiente del ordenador conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx.
3. Si el CD se carga automáticamente, haga doble clic en el archivo *therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe* para iniciar la instalación. También puede localizar e iniciar este archivo ejecutable mediante el explorador de archivos del ordenador conectado.

4. Se abre el asistente para la configuración de *therascreen* EGFR CE Assay Package. Haga clic en "Next" (Siguiente) para continuar (ilustración 41).

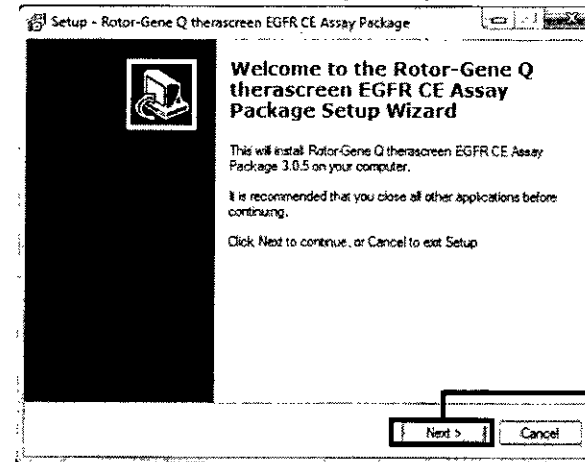


Ilustración 41. Cuadro de diálogo "Setup Wizard" (Asistente para la configuración) (1 = botón "Next" [Siguiente])

5. Lea el Acuerdo de licencia del cuadro de diálogo y marque la casilla "I accept the agreement" (Acepto el acuerdo) para aceptar el acuerdo. Haga clic en "Next" (Siguiente) para continuar (ilustración 42).

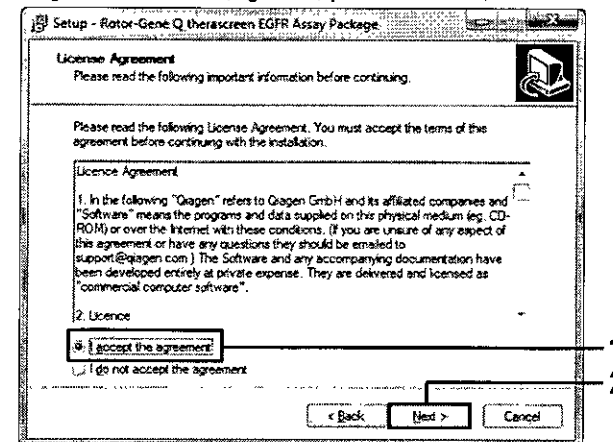


Ilustración 42. Cuadro de diálogo "License Agreement" (Acuerdo de licencia) (1 = "I accept the agreement" [Acepto el acuerdo], 2 = Botón "Next" [Siguiente])

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

6. La configuración se inicia automáticamente. Una vez finalizada la instalación, se abre el último cuadro de diálogo de "Setup Wizard" (Asistente para la configuración). Haga clic en "Finish" (Finalizar) para salir del asistente (ilustración 43).

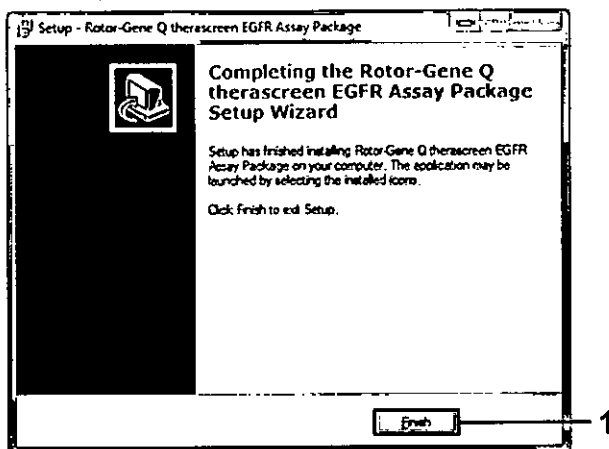


Ilustración 43. Finalización del asistente para la configuración (1 = Botón "Finish" [Finalizar])

7. Reinicie el ordenador.

El asistente genera automáticamente accesos directos a los moldes "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" y "therascreen EGFR CE Locked Template" y los coloca en el escritorio.



Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visite nuestro Centro de servicio técnico en el sitio www.qiagen.com/Support. llame al 00800-22-44-6000, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
therascreen EGFR RGG PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: ensayo de control, 7 ensayos de mutación, control positivo, Taq ADN polimerasa, agua para control sin molde (NTC) y agua para la dilución de la muestra	874111
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 extracciones: 50 columnas QIAamp MinElute®, proteinasa K, tampones y tubos de recogida (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q		
Rotor-Gene Q MDx Splex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de melting de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033
Rotor-Gene Q MDx Splex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de melting de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002032
Accesorios de Rotor-Gene Q		
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	
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapones para 10.000 reacciones	



7035

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario 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.

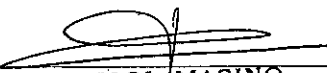
Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

W


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

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.


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



7085

La compra de este producto permite al comprador utilizarlo en el rendimiento de servicios diagnósticos para diagnóstico humano in vitro. Por lo presente no se otorga ninguna patente general ni otra licencia de ningún tipo, distinta de este derecho específico de uso derivado de la compra.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, MinElute®, RotorGene®, Scorpions®, thetascreen® (Grupo QIAGEN); FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.).

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

Acuervo de licencia limitada para el kit thetascreen EGFR RGG PCR

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de las siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para otros usuarios. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit 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 de los kits 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 costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir 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.

HB-1909-002 © 2012-15 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Australia # techservice-au@qiagen.com

Austria # techservice-at@qiagen.com

Belgium # techservice-bn@qiagen.com

Brazil # suporte tecnico.brasil@qiagen.com

China # techservice-cn@qiagen.com

Denmark # techservice-nordic@qiagen.com

Finland # techservice-nordic@qiagen.com

France # techservice-fr@qiagen.com

Germany # techservice-de@qiagen.com

Hong Kong # techservice-hk@qiagen.com

India # techservice-india@qiagen.com

Ireland # techservice-uk@qiagen.com

Italy # techservice-it@qiagen.com

Japan # techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) # techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg # techservice-bn@qiagen.com

Mexico # techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands # techservice-bn@qiagen.com

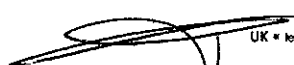
Norway # techservice-nordic@qiagen.com

Singapore # techservice-sg@qiagen.com

Sweden # techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland # techservice-ch@qiagen.com

UK # techservice-uk@qiagen.com


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



7085



PROYECTO DE RÓTULOS - *therascreen* EGFR RGQ Kit, V2

1. RÓTULOS EXTERNOS



therascreen[®]
EGFR RGQ PCR Kit ∇ ₂₄, V2

REF 874111 **CONT** 14 tubes

For use with Rotor-Gene[®] Q MDx instruments



therascreen[®]
EGFR RGQ PCR Kit ∇ ₂₄, V2



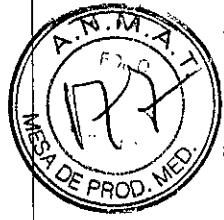
GTIN 04053228007685
LOT 1151234567
EXP 2015-12-31
MAT 1089028

-15°C
-30°C *[handwritten mark]*

QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street North, Manchester, M15 6SH, UK
Tel: +44 (0) 800 234 3986

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 8483
DT - TECNOLAB S.A.

[Handwritten signature]



2. RÓTULOS EXTERNOS

MAT 1073403
 EGFR Control
 Reaction Mix
 600 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073407
 EGFR T790M
 Reaction Mix
 600 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073410
 EGFR Deletions
 Reaction Mix
 600 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073413
 EGFR L858R
 Reaction Mix
 600 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073416
 EGFR L861Q
 Reaction Mix
 600 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073419
 EGFR G719X
 Reaction Mix
 600 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073422
 EGFR S768I
 Reaction Mix
 600 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073425
 EGFR Insertions
 Reaction Mix
 600 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073428
 EGFR
 Positive Control
 300 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1067627
 Water for NTC
 1.9 ml
 2012-12-31 -15°C
 -25°C
 QIAGEN
 [LOT]XXXXXXXXXX

MAT 1067630
 Water for sample
 dilution
 1.9 ml
 2012-12-31 -15°C
 -25°C
 QIAGEN
 [LOT]XXXXXXXXXX

MAT 1075058
 Taq
 DNA Polymerase
 80 µl [LOT]XXXXXXXXXX
 2014-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN
 QIAGEN GmbH Hilfen

E

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

Diciembre de 2014

Manual de uso del kit *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR


Versión 1

IVD

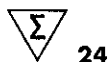
Para uso en diagnóstico *in vitro*
Para uso con equipos Rotor-Gene[®] Q MDx

CE

REF 870311

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

R1  1090234



24

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.

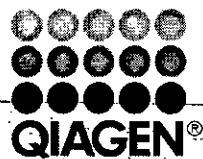
QIAGEN define los estándares en los siguientes campos:

- 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.



 **tecnolab s.a.**
estomba 964 . c1427cov
capital federal . argentina
tel. 54 11 4555 0010
54 11 4859 5300
fax 54 11 4553 3331
info@tecnolab.com.ar
www.tecnolab.com.ar
ISO 9001:2008 certificada




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



Sample & Assay Technologies

Contenido

Uso previsto	4
Resumen y explicación	4
Principio del procedimiento	5
Materiales suministrados	8
Contenido del kit	8
Materiales requeridos pero no suministrados	8
Advertencias y precauciones	10
Información de seguridad	10
Precauciones generales	10
Almacenamiento y manipulación de reactivos	11
Manipulación y almacenamiento de muestras	12
Procedimiento	13
Protocolos	
■ 1: detección de mutaciones de EGFR	14
■ 2: configuración del equipo Rotor-Gene Q EGFR	18
Guía de resolución de problemas	33
Control de calidad	34
Limitaciones	34
Características de rendimiento	35
Referencias	42
Símbolos	42
Información de contacto	43
Apéndice A: detalles de mutación	44
Información para pedidos	45

Uso previsto

El kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la detección de deleciones del exón 19, sustituciones de los exones 20 y 21 (T790M y L858R, respectivamente) en el gen que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y para la obtención de una valoración cualitativa del estado de mutación. Los resultados tienen como objetivo ayudar al personal médico a identificar pacientes con NSCLC que puedan beneficiarse de un tratamiento con IRESSA (gefitinib), cuando no es posible realizar la evaluación con una muestra de tejido.

El kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR está concebido para el uso por parte de personal cualificado en entornos profesionales de laboratorio con muestras de ADN extraídas de plasma obtenido de sangre de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

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

Resumen y explicación

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

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

- Deleciones en el exón 19
- T790M
- L858R

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 nativo. Los límites de selectividad y detección son superiores a los de otras tecnologías como la de secuenciación mediante terminadores fluorescentes.

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

Principio del procedimiento

El kit *therascreen* EGFR Plasma 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 primer 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 primer 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 nivel bajo.

Scorpions

La detección de la amplificación se realiza mediante la tecnología Scorpions. La tecnología Scorpions utiliza moléculas bifuncionales que contienen un primer 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. Esto provoca un aumento de la fluorescencia en el tubo de reacción.

Formato del kit

El kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR se suministra con 4 ensayos:

- 1 ensayo de control (Ctrl)
- 3 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 reacción de PCR errónea.

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 primers y la sonda están diseñados para evitar cualquier polimorfismo conocido del gen EGFR.

Ensayos de mutación

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

Controles

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

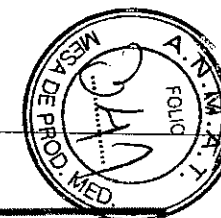
Control positivo

Cada serie debe contener un control positivo en los tubos del 1 al 4. El kit *therascreen* EGFR Plasma 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 ("no template control", NTC – control sin molde) en los tubos del 9 al 12. El NTC está formado por agua exenta de nucleasas (H₂O), que se utiliza como "molde" para 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.

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



706/5

Evaluación de la reacción de control interno

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 desplazar a la amplificación del control interno, por lo que el valor de CT (HEX) del control interno generado podría estar fuera del intervalo especificado. Los resultados de FAM siguen siendo válidos para estas muestras.

Materiales suministrados

Contenido del kit

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit			
N.º de referencia			(24)
Número de reacciones			870311
Número de reacciones			24
Rojo	Control Reaction Mix (mezcla de reacción para control o CTRL)	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
Beis	EGFR Positive Control (control positivo de EGFR)	PC	300 µl
Menta	Taq DNA Polymerase (Taq ADN polimerasa)	Taq	2 x 80 µl
Blanco	Nuclease-Free Water for No Template Control (agua exenta de nucleasas para el control sin molde)	NTC	1 x 1,9 ml
Blanco	Nuclease-Free Water for Dilution (agua exenta de nucleasas para la dilución)	Dil	1 x 1,9 ml

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 seguridad (SDS), que puede solicitar al proveedor del producto.

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

- Kit para el aislamiento de ADN (consulte "Procedimiento", en la página 13)
- 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)
- Agua de baño o dispositivo similar que permita incluir tubos para centrífuga de 50 ml a una temperatura de 60 °C
- Bloque térmico o dispositivo similar que permita la incubación a una temperatura de 56 °C*
- Hielo picado
- Centrífuga de mesa* con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Vórtex
- Equipo Rotor-Gene Q MDx** con canales de fluorescencia para Cycling Green y Cycling Yellow (detección de FAM y HEX, respectivamente)
- Software Rotor-Gene Q, versión 2.3
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (tubos y tapones de tiras de 0,1 ml) para uso con un rotor de 72 pocillos (referencia 981103 ó 981106)
- Tubos de microcentrífuga exentos de DNAsa, RNAsa y ADN para la preparación de las mezclas maestras
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (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, referencia 9018901)

* Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante. Esta no es una lista de proveedores completa.

† No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona.

‡ En otros países, si corresponde, se puede utilizar el equipo Rotor-Gene Q 5plex HRM con una fecha de producción de mayo de 2011 o posterior. La fecha de producción se puede obtener del número de serie situado en la parte posterior del equipo. El número de serie presenta el formato "mmaannn", donde "mm" indica el mes de producción en dígitos, "aa" indica los dos últimos dígitos del año de producción y "nnn" indica el identificador exclusivo del equipo.

Advertencias y precauciones

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional

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 seguridad (SDS). Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

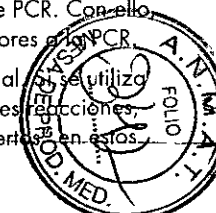
Precauciones generales

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 añádalos a la mezcla de reacción en una zona separada físicamente.
- Descongele bien todos los componentes a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de iniciar un ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifúguelos 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 distinta a la utilizada para añadir 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 a los reactivos necesarios para rellenar "volúmenes muertos" en estos equipos.



70651

Nota: todos los reactivos del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR se han formulado específicamente para su uso con las pruebas mencionadas. Todos los reactivos suministrados con el kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR se suministran para su uso exclusivo con otros reactivos del mismo kit *therascreen* EGFR Plasma 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 Plasma 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 Plasma RGQ PCR se suministra en hielo seco. Si alguno de los componentes del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR no está congelado a la llegada, si el embalaje externo se ha abierto durante el transporte o si el envío no incluye la nota de embalaje, las instrucciones de uso o los reactivos, póngase en contacto con los departamentos del servicio técnico de QIAGEN (visite www.qiagen.com).

Una vez recibido, almacene inmediatamente el kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR en un congelador a una temperatura constante de entre -15 y -30 °C y protéjalo de la luz. Si se almacena en las condiciones especificadas, el kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

Una vez abiertos, los reactivos deben almacenarse en el embalaje original a una temperatura comprendida entre -15 °C y -30 °C durante 90 días o hasta la fecha de caducidad indicada en el embalaje, el periodo que transcurra primero. No es aconsejable descongelarlo y volver luego a congelarlo. No exceda el máximo de 8 ciclos de congelación-descongelación.

Los reactivos deben descongelarse a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 4,5 horas. Cuando los reactivos están listos para ser utilizados, pueden configurarse las reacciones de PCR. Los tubos de Rotor-Gene Q, que contienen las mezclas maestras y la muestra de ADN, pueden cargarse en el equipo Rotor-Gene Q MDx inmediatamente. El tiempo total

previo al análisis después de configurar las reacciones de PCR no debería superar:

■ 7 horas si se almacenan a temperatura ambiente

Nota: este tiempo incluye tanto la configuración de la PCR como el almacenamiento.

■ 18 horas si se almacenan en un congelador (-8°C)

Nota: este tiempo incluye tanto la configuración de la PCR como el almacenamiento.

Nota: los primers Scorpions (como todas las moléculas marcadas con fluorescencia) incluidos en los reactivos de la mezcla de reacción son muy sensibles a la luz. Proteja los reactivos de control y de la mezcla de reacción de la luz para evitar el blanqueamiento.

Los reactivos del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR ofrecen una dilución óptima, por lo que no es necesario realizar más purificaciones ni ningún otro tratamiento antes de utilizarlos para el análisis según las indicaciones de las *Instrucciones de uso (Manual)* del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR.

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.

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 plasma. Las muestras se deben transportar de acuerdo con la metodología anatomopatológica estándar para garantizar la calidad de las muestras.

MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT11 TECNO LAB S.A.

Procedimiento

Extracción de ADN

Las características de rendimiento de este kit se han determinado mediante ADN extraído con el kit QIAamp® Circulating Nucleic Acid (n.º de referencia 55114). Si se utiliza el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid, lleve a cabo la extracción del ADN de acuerdo con las instrucciones del manual y tenga en cuenta las recomendaciones siguientes:

- El volumen inicial de plasma es de 2 ml.
- Antes de realizar la extracción, es necesario centrifugar 2 ml de plasma a 3.000 rpm durante 2 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- El volumen de proteinasa K debe ser de 250 µl.
- La digestión de la proteinasa K debe realizarse durante 1 hora a una temperatura de 60 °C.
- El ADN genómico purificado debe eluirse en 55 µl de tampón AVE (suministrado en el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid).
- Almacene el ADN genómico purificado a una temperatura de entre -15 y -30 °C.

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

Protocolo 1: detección de mutaciones de EGFR

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de iniciar el procedimiento, consulte el apartado "Precauciones generales", en la página 10.
- Tómese su tiempo para familiarizarse con el equipo Rotor-Gene Q MDx antes de iniciar el protocolo. Consulte el manual del usuario del equipo.
- 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.
- Pueden analizarse hasta 16 muestras en una placa.
- 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.

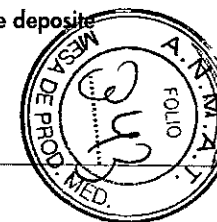
Antes de comenzar

- Antes de cada uso, descongele todos los reactivos durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 4,5 horas a temperatura ambiente (15-25 °C), mézclelos invirtiendo cada tubo 10 veces y centrifúguelos brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo.
- Asegúrese de que la enzima *Taq* se encuentra a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C) antes de cada uso. Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

Procedimiento

1. Descongele totalmente todas 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) durante al menos 1 hora. 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.

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



7065

Tabla 1. Tiempos de descongelación, configuraciones de la PCR y temperaturas de almacenamiento

Tiempo de descongelación		Temp. almac. posterior a config. de PCR	Tiempo máximo config. de PCR y almacenamiento
Mínimo	Máximo		
1 hora	4,5 horas	Temperatura ambiente (15-25 °C)	7 horas
1 hora	4,5 horas	2-8 °C	18 horas

Nota: la configuración de la PCR debe realizarse a temperatura ambiente. Por "Almacenamiento" se entiende el tiempo transcurrido entre la finalización de la configuración de la PCR y el inicio de la serie de PCR en el equipo Rotor-Gene Q MDx.

Nota: descongele la enzima *Taq* ADN polimerasa (tubo para *Taq*) a temperatura ambiente (15-25 °C) a la vez que otros reactivos (consulte el apartado "Almacenamiento y manipulación de reactivos", en la página 11). Centrifugue el tubo brevemente para que la enzima se deposite en el fondo del tubo.

2. Etiquete 4 tubos para microcentrifuga (no suministrados) de acuerdo con cada una de las mezclas de reacción correspondientes que se muestran en la tabla 2. Prepare suficientes mezclas maestras (mezcla de reacción para control o mutación [tubo para CTRL, T790M, deleciones y L858R] más *Taq* ADN polimerasa [*Taq*]) para las muestras de ADN, una reacción para control positivo (tubo para PC) de EGFR y agua exenta de nucleasas como reacción para control sin molde (tubo para NTC), según los volúmenes indicados en la tabla 2. Incluya reactivos para una muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR. Las mezclas maestras contienen todos los componentes necesarios para la PCR excepto la muestra.

Tabla 2. Preparación de las mezclas maestras*

Ensayo	Tubo para mezcla de reacción	Volumen de mezcla de reacción	Volumen de <i>Taq</i> ADN polimerasa (tubo para <i>Taq</i>)
Control	CTRL	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)
T790M	T790M	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)
Deleciones	Del	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)
L858R	L858R	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)

* Cuando realice la mezcla maestra, no olvide preparar la cantidad suficiente para 1 muestra adicional a fin de que exista excedente suficiente para la configuración de la PCR.

Nota: cuando prepare la mezcla maestra, añada al tubo correspondiente primero el volumen necesario de mezcla de reacción para control o mutación y, por último, la enzima *Taq* ADN polimerasa.

3. Coloque el número adecuado de tiras de 4 tubos para PCR (cada tira consta de 4 tubos) en el bloque de carga según la disposición de la tabla 3. No tape los tubos.

Nota: deposite los tapones en el contenedor de plástico hasta que los necesite.

4. Tape el tubo de la mezcla maestra e inviértalo 10 veces para mezclar la mezcla maestra. A continuación, centrifúguelo brevemente para asegurarse de que la muestra se encuentre en el fondo del tubo. Añada inmediatamente 20 µl de la mezcla maestra en cada una de las tiras de tubos para PCR correspondiente.

5. 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 12) y tápelos.

6. Añada 5 µl de cada muestra a los tubos de muestra (tubos para PCR del 5 al 8, del 13 al 16 y del 17 al 20) y tápelos.

7. Añada 5 µl de control positivo (PC) de EGFR a los tubos de control positivo (números de los tubos de PCR: del 1 al 4) y tápelos. Cada muestra de ADN se debe analizar con el ensayo de control y con todos los ensayos de mutación. La disposición se muestran en la tabla 3.

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

Tabla 3. 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
Ensayo	Número de muestras								
	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ctrl	5	13	21	29	37	45	53	61	69
T790M	6	14	22	30	38	46	54	62	70
Deleciones	7	15	23	31	39	47	55	63	71
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72

8. Con un rotulador permanente, marque los tapones de los primeros tubos de cada tira de 4 tubos para PCR (p. ej., posiciones 1, 5 y 9, etc.) para marcar la orientación de carga de los tubos en el rotor de 72 pocillos del equipo Rotor-Gene Q MDx.
9. Coloque todas las tiras de 4 tubos para PCR en las posiciones apropiadas del rotor de 72 pocillos 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.
10. Si el rotor no está lleno, rellene los espacios restantes con tubos vacíos tapados.
11. Coloque inmediatamente el rotor en el equipo Rotor-Gene Q MDx. Asegúrese de que el anillo de fijación (accesorio del equipo Rotor-Gene Q MDx) se encuentra en la parte superior del rotor para proteger los tubos durante la serie.
12. Consulte la configuración del equipo Rotor-Gene Q MDx ("Protocolo 2: configuración del equipo Rotor-Gene Q EGFR", en la página 18) para crear el perfil de temperatura e iniciar la serie.

Protocolo 2: configuración del equipo Rotor-Gene Q EGFR

En resumen, los parámetros de ciclo son los siguientes.

Tabla 4. 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

1. Haga doble clic en el icono del software Rotor-Gene Q, versión 2.3, situado en el escritorio del PC conectado al equipo Rotor-Gene Q MDx. Seleccione la pestaña "Advanced" (Avanzado) dentro del cuadro de diálogo "New Run" (Nueva serie) que se muestra.
2. 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).
3. 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) (consulte la ilustración 1).

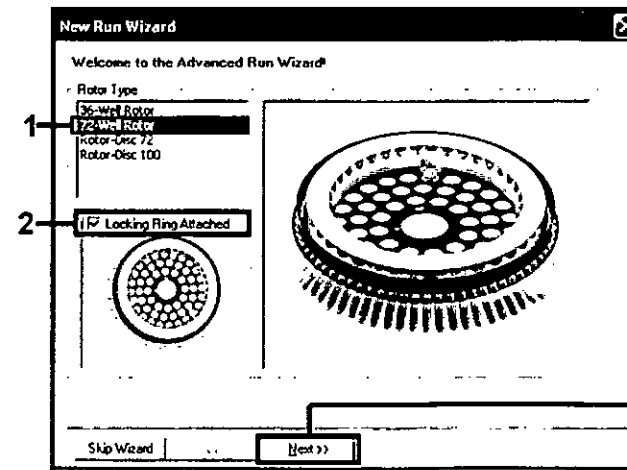
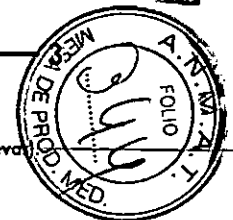


Ilustración 1. Cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas)

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

7065



- 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) (consulte la ilustración 2).

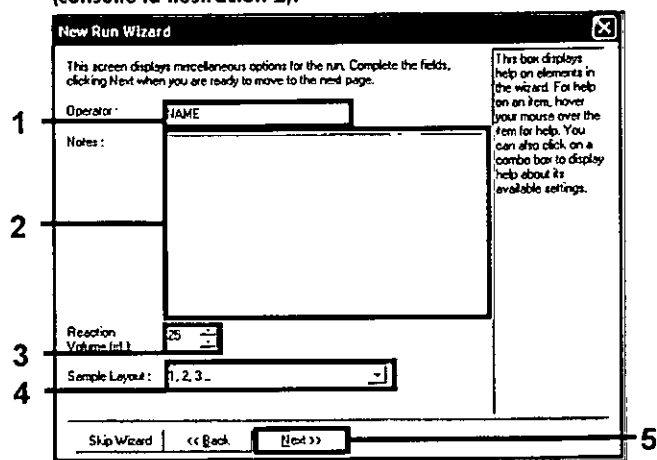


Ilustración 2. Introducción del nombre del usuario y los volúmenes de reacción.

- Haga clic en el botón "Edit Profile" (Editar perfil) situado en el cuadro de diálogo "New Run Wizard" (Asistente para series nuevas) (consulte la ilustración 3) y programe los parámetros de la serie analítica a partir de los pasos siguientes.

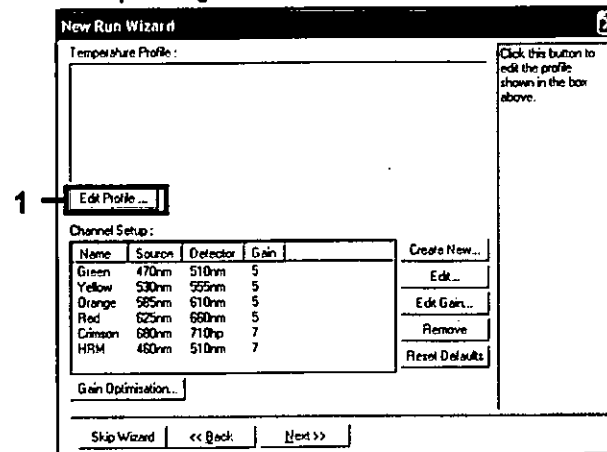


Ilustración 3. Edición del perfil.

- Haga clic en el botón "Insert after" (Insertar después) y seleccione "New Hold at Temperature" (Nueva fase de temperatura) (consulte la ilustración 4).

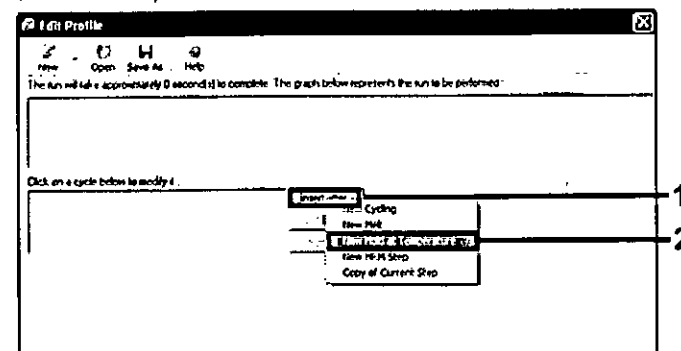


Ilustración 4. Inserción de un paso de incubación inicial.

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

7. Cambie el valor de "Hold Temperature" (Mantener temperatura) a 95 °C y "Hold Time" (Mantener tiempo) en "15 mins 0 secs" (15 min 0 s). Haga clic en el botón "Insert After" (Insertar después) y seleccione "New Cycling" (Ciclos nuevos) (consulte la ilustración 5).

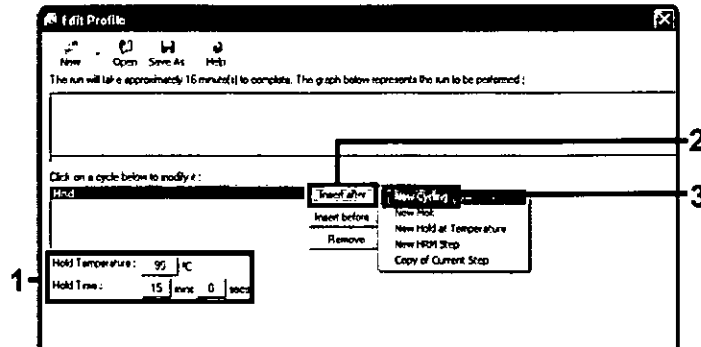


Ilustración 5. Paso de incubación inicial a 95 °C.

8. 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) (consulte la ilustración 6).

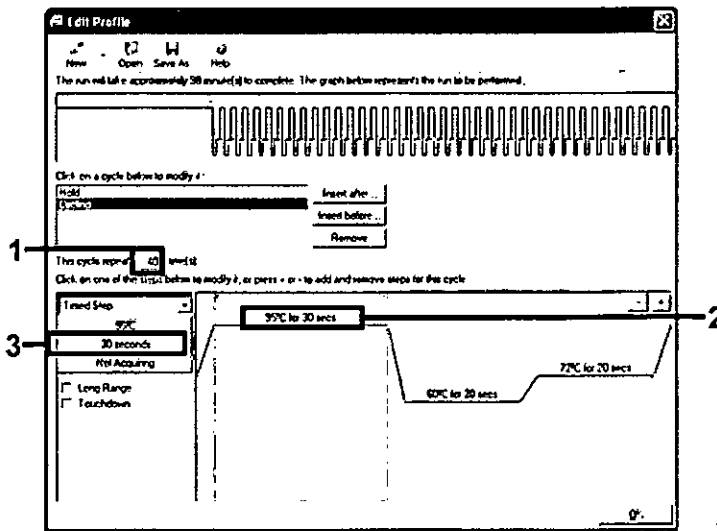


Ilustración 6. Paso de ciclado a 95 °C.

9. 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 paso, seleccione el botón "Not Acquiring" (No adquirir) (consulte la ilustración 7).

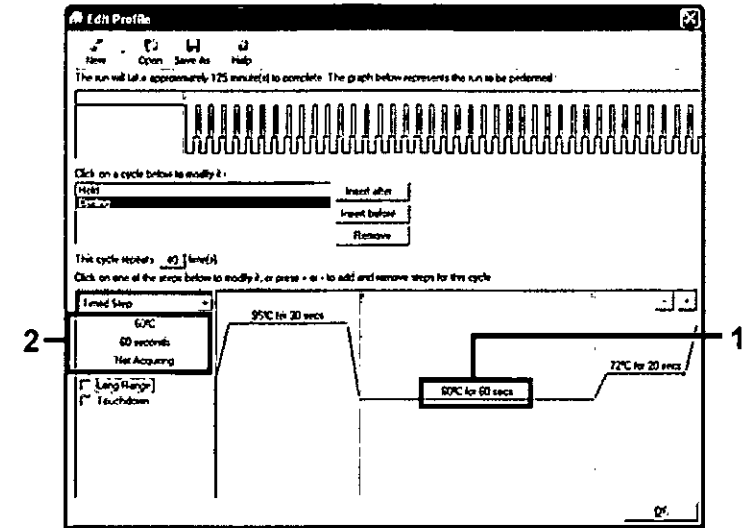


Ilustración 7. Paso de ciclado a 60 °C.

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



10. 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) (consulte la ilustración 8).

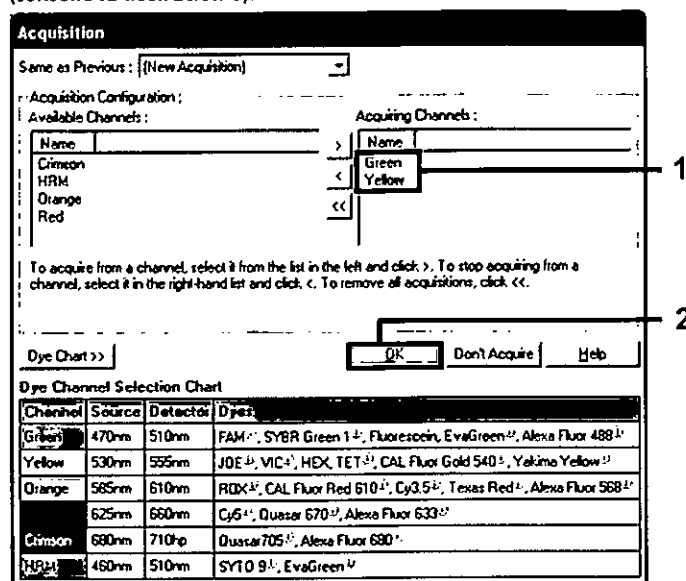


Ilustración 8. Adquisición en el paso de ciclado a 60 °C.

11. Seleccione el tercer paso y elimínelo mediante el botón "-". Haga clic en "OK" (Aceptar) (consulte la ilustración 9).

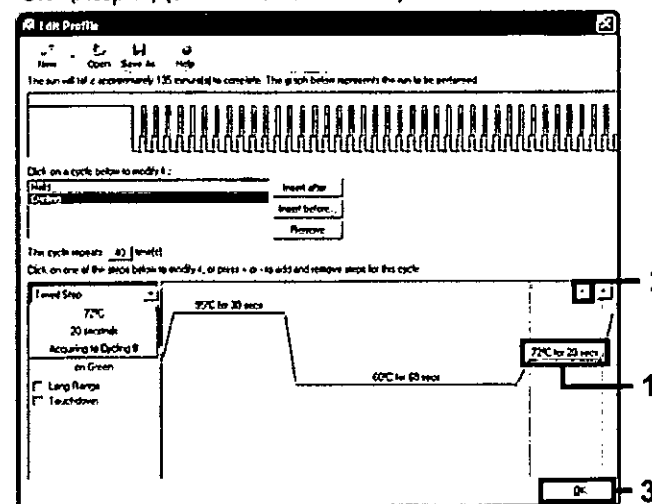


Ilustración 9. Eliminación del paso de extensión.

12. En el cuadro de diálogo siguiente, haga clic en el botón "Gain Optimisation" (Optimización de ganancia) (consulte la ilustración 10).

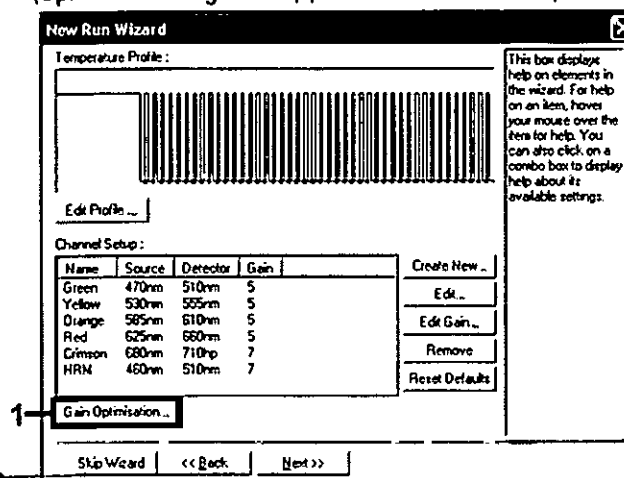


Ilustración 10. Optimización de la ganancia.

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
BT TECNO LAB S.A.

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

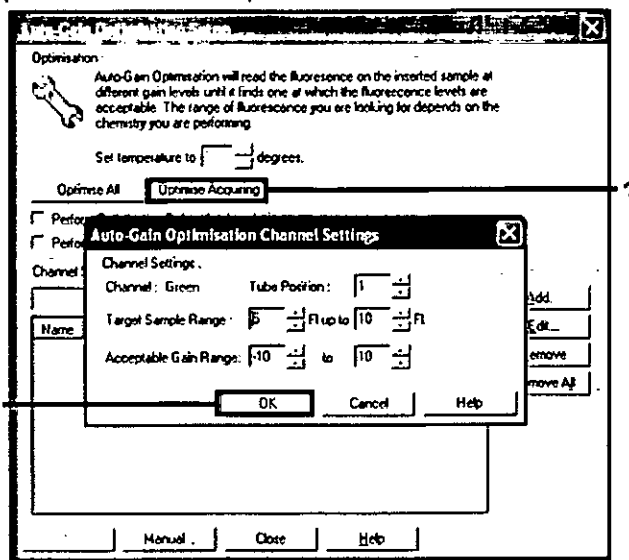


Ilustración 11. Optimización de la ganancia automática para el canal verde.

14. 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 (consulte la ilustración 12).

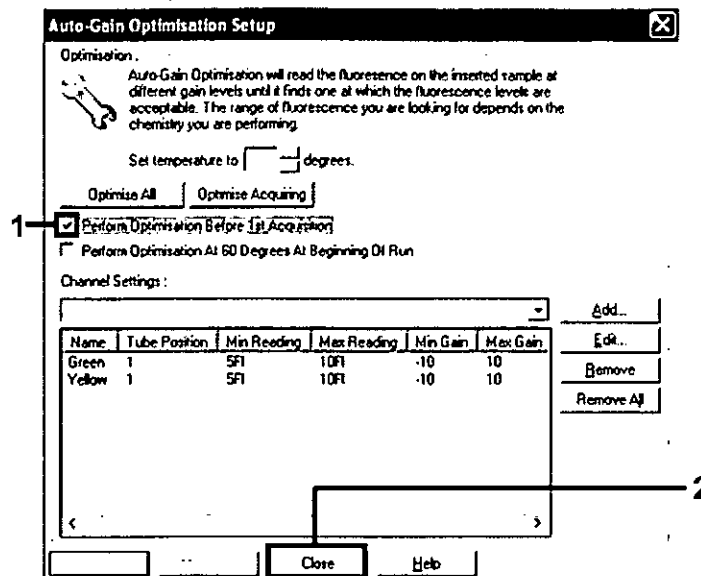


Ilustración 12. Selección de los canales verde y amarillo.

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

Análisis de los datos de valoración de las mutaciones

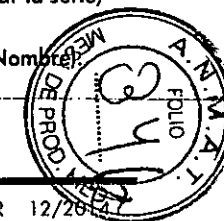
Una vez completada la serie, debe analizar los datos con el siguiente procedimiento.

Configuración del análisis del software

1. Utilice el software Rotor-Gene Q (2.3) para abrir el archivo adecuado.
2. Si no se ha introducido el nombre de las muestras antes de realizar la serie, haga clic en "Edit Samples" (Editar muestras).
3. Introduzca los nombres de las muestras en la columna "Name" (Nombre).

Nota: deje en blanco los nombres de los pocillos vacíos.

MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA M.N. 9483
DT TECNOLOGÍA S.A.



4. Haga clic en "Analysis" (Análisis). En la página de análisis, haga clic en "Cycling A, Yellow" (Ciclado A, amarillo) para comprobar el canal HEX.
5. Compruebe que la opción "Dynamic Tube" (Tubo dinámico) está resaltada. Haga clic en "Slope Correct" (Pendiente correcta) y "Linear Scale" (Escala lineal).
6. Haga clic en "Take Off Adj." (Ajuste de inicio) e introduzca los valores "15.01" y "20.01" tal como se indica en la ilustración 13.

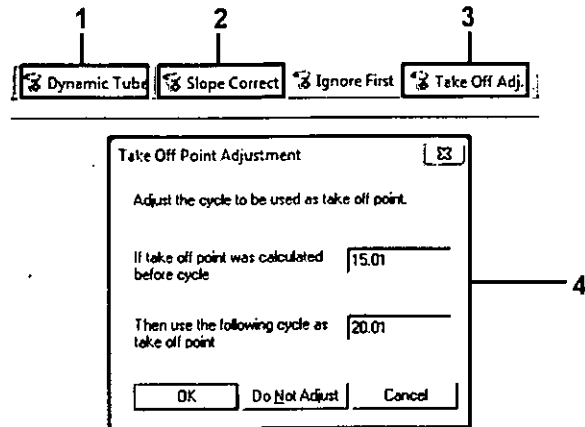


Ilustración 13. Configuración de normalización del análisis de EGFR. 1 = Botón "Dynamic Tube" (Tubo dinámica), 2 = Botón "Slope Correct" (Pendiente correcta), 3 = Botón "Take Off Adj." (Aj. de inicio), 4 = Ventana de diálogo "Take Off Point Adjustment" (Ajuste del punto de inicio) con los valores de los parámetros.

7. Configure el umbral en 0,02 y compruebe los valores de C_T de HEX.
8. En la página de análisis, haga clic en "Cycling A, Green" (Ciclado A, verde) para ver el canal FAM. Configure los parámetros tal como se indica en la ilustración 13 (arriba).
9. El tubo dinámico debe aparecer marcado. Haga clic en "Slope Correct" (Pendiente correcta) y "Linear Scale" (Escala lineal).
10. Configure el umbral en 0,075 y compruebe los valores de C_T de FAM.

Análisis de control de la serie

Una vez finalizada la serie, debe analizar los datos tal 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. Para garantizar que la serie está configurada correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación de 29,85 a 35,84 en el canal amarillo (HEX) (control interno).

La serie no es válida si existe amplificación positiva en el canal verde y/o una amplificación fuera del intervalo de 29,85 a 35,84 en el canal amarillo.

- Control positivo: el control positivo (PC) de EGFR debe generar un valor de C_T para cada muestra de reacción dentro del intervalo que se indica en la tabla 5 (incluidos los valores especificados). Una serie con un valor de control positivo fuera de este intervalo indica un problema de configuración en el ensayo, por lo que la serie debe señalarse como errónea. Si el control positivo genera un valor de C_T dentro del intervalo (FAM), pero el valor de C_T del control interno (HEX) se encuentra fuera del intervalo de 29,85 a 35,84, puede continuar con el análisis.

Nota: no deben utilizarse los datos de las muestras si falla el control negativo o positivo.

Tabla 5. Intervalo de C_T aceptable para los controles de series

Control de reacción	Ensayo	Canal	Intervalo de C_T
Control positivo	Control	Verde (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Verde (FAM)	30,22-34,98
	Deleciones	Verde (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Verde (FAM)	29,97-34,81
Control sin molde	Las 8 mezclas de reacción	Verde (FAM)	≥ 40,00
		Amarillo (HEX)	29,85-35,84

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

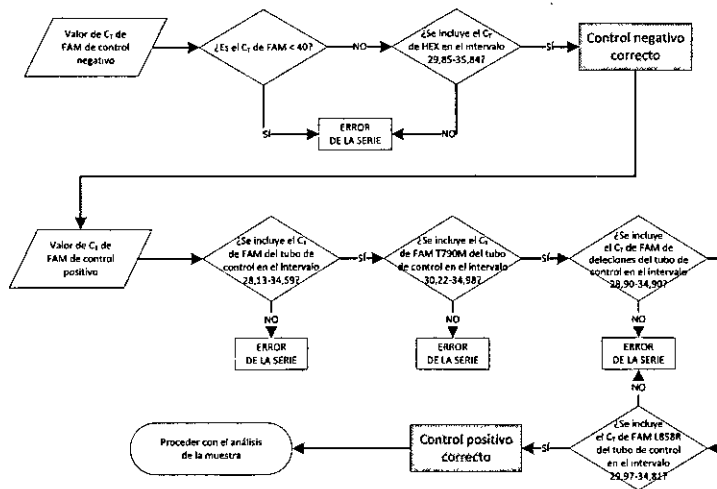


Ilustración 14. Flujo de trabajo del análisis de control de la serie.

Siempre que ambos controles de series sean válidos, cada valor de C_T del ensayo de control de la muestra debe estar comprendido en el intervalo de 23,70 a 31,10 en el canal verde (FAM). Consulte la tabla 6.

Tabla 6. Intervalo de C_T de FAM aceptable para la reacción de control de la muestra

Intervalo de C_T de FAM aceptable para la reacción de control de la muestra		
Mezcla de reacción	Canal	Intervalo de C_T aceptable
Control	Verde (FAM)	23,70-31,10

Si la muestra se encuentra fuera de este intervalo, se proporciona la guía siguiente.

- **Valor de C_T del ensayo de control de la muestra < 23,70:** las muestras con un valor de C_T de control < 23,70 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 intervalo 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 > 31,10:** la muestra no contiene una cantidad suficiente de ADN para realizar el análisis.

Siempre que ambos controles de series sean válidos y el ensayo de control esté comprendido en el intervalo indicado en la tabla 6, cada valor de C_T de la mutación de muestras debe encontrarse dentro del intervalo detallado en la tabla 7 en el canal verde (FAM). Si la muestra se encuentra fuera de este intervalo, se proporciona la guía siguiente.

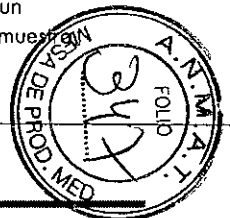
Tabla 7. Valores de reacción de mutación de muestras aceptables

Valores de reacción de mutación de muestras aceptables			
Reacciones	Mezcla de reacción	Canal	Intervalo de C_T
	T790M	Verde (FAM)	0,00-40,00
Reacción de mutación	Delecciones	Verde (FAM)	0,00-40,00
	L858R	Verde (FAM)	0,00-40,00
	Las 3 mutaciones	Amarillo (HEX)	29,85-35,84

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.

- **El valor de C_T del control interno se encuentra dentro del intervalo 29,85-35,84:** no hay ADN amplificable de EGFR.
- **Valor de C_T del control interno fuera del intervalo de 29,85 a 35,84:** 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.



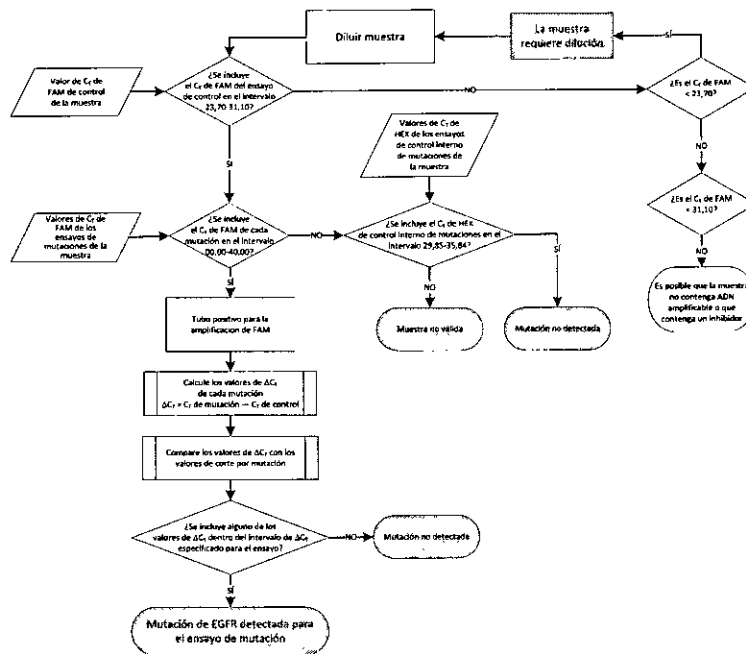


Ilustración 15. Organigrama del análisis de mutación.

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

Es necesario comparar los valores de FAM de las tres mezclas para reacción de mutación con los valores que se muestran en la tabla 7.

Calcule el valor de ΔCt para todas las muestras de mutación que presenten amplificación positiva tal y como se indica a continuación. Es importante utilizar los valores de Ct 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 ΔCt de la muestra con el punto de corte del ensayo en cuestión (consulte la tabla 8). Compruebe que se aplique el punto de corte correcto para cada ensayo.

Tabla 8. Valores de corte del ensayo de mutación

Ensayos de mutación	Valores de corte de ΔCt
T790M	≤ 7,40
Deleciones	≤ 8,00
L858R	≤ 8,90

El punto de corte es el punto a partir del cual una señal positiva podría ser la respuesta a una señal de fondo del primer ARMS en ADN nativo. Si el valor de ΔCt 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 Ct de mutación de FAM, es necesario realizar una evaluación del valor de Ct de control interno (HEX) para determinar si la mutación no se detecta o si el ensayo no es válido. Si el valor de Ct de HEX se encuentra entre 29,85 y 35,84, la mutación no se detecta. Si el valor de Ct de HEX se encuentra fuera de este intervalo, 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 válido según los siguientes criterios.

- **Mutación detectada:** la amplificación positiva de FAM y el valor de ΔCt 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 ΔCt están por encima del valor de corte y HEX (control interno) se encuentra dentro del intervalo 29,85-35,84.
- **No válido:** la amplificación de FAM es negativa y la amplificación de HEX se encuentra fuera de las especificaciones.

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

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a 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: 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 equipo Rotor-Gene Q 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 11). | 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 Plasma 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 producido contaminación durante la preparación de la PCR. | Repita la PCR con 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. |
|--|--|

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *therascreen* EGFR Plasma 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 el equipo Rotor-Gene Q MDx puede utilizar el producto.

Los estudios de validación analítica han utilizado ADN humano extraído de muestras de plasma.

El producto es para uso exclusivo en el termociclador para PCR en tiempo real de Rotor-Gene Q MDx.

Para obtener unos resultados óptimos, es preciso que siga detenidamente las instrucciones indicadas en el manual de uso del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR. No se recomienda la dilución de reactivos distintos a los descritos en este manual. De lo contrario, el rendimiento se verá disminuido.



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

Sensibilidad analítica – Límite de blanco (LOB)

Para valorar el rendimiento del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR en ausencia de molde y para garantizar que una muestra blanco o una muestra con ADN nativo no genere una señal analítica que pueda indicar una concentración baja de la mutación, se evaluó el ADN nativo de EGFR obtenido de plasma NSCLC de 59 muestras diferentes. Se cumplió el criterio de aceptación del estudio (como mínimo el 95% de las muestras nativas debe presentar un valor de ΔC_T por encima del valor de corte respectivo).

Límite de detección (LOD)

El valor del LOD es el porcentaje mínimo de ADN mutado que se puede detectar en un fondo de ADN nativo cuando el ADN amplificable total (dentro del intervalo de introducción) identifica mutaciones correctamente al 95% para cada muestra positiva para mutación (C95). El intervalo de funcionamiento de la introducción del ADN establecido para el ensayo viene definido por el intervalo especificado previamente para el valor de C_T comprendido entre 23,70 y 31,10.

El LOD se determinó con niveles bajos de ADN introducido (valor de C_T de control de aproximadamente 30,10) a partir de ADN derivado de muestras de tejido fijadas en formalina e impregnadas en parafina (FFPE) para el kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. El LOD se determinó mediante muestras clínicas de FFPE y líneas celulares FFPE con niveles bajos de ADN introducido para estas mutaciones del gen EGFR.

Se verificaron los valores del LOD establecidos mediante tejido FFPE para el kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR con ADN obtenido de muestras artificiales de plasma positivas para la mutación.

En la tabla 9 que aparece a continuación, se presentan los valores del LOD finales, que indican el porcentaje de mutación con el que se obtiene una probabilidad predicha de identificaciones correctas del 95% para cada una de las mutaciones.

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

Exón	Mutación	ID COSMIC*	Valores de LOD (%)
20	T790M	6240	17,5*
		6223	6,4*
		13551	4,24*
		12728	2,43 [†]
		12419	16,87 [†]
		12422	3,24 [†]
		6218	9,83 [†]
		6210	7,44 [†]
		6254	10,2*
		12370	8,1*
19	Deleciones	12678	10,40 [†]
		12367	4,39 [†]
		12384	7,54 [†]
		6225	6,5*
		6220	2,7*
		6255	0,81*
		12382	1,45*
21	L858R	12383	4,58*
		12387	4,91 [†]
		12369	4,94*
		6224	5,94*

* Valores de LOD verificados en plasma como parte del estudio de confirmación del LOD del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR.

[†] Estas mutaciones no se confirmaron en plasma.

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

Sensibilidad analítica – Valores de ΔC_T

Se aplicó un enfoque basado en los riesgos respecto a las tasas de falsos positivos cuando se establecieron los valores de corte del ensayo, y se utilizaron estimaciones de los valores del LOB como componente para desarrollar los valores de corte. Los respectivos valores de corte de ΔC_T para cada ensayo de mutación del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de corte de ΔC_T del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR

Ensayo de mutación	Valores de corte de ΔC_T
T790M	$\leq 7,40$
Delección	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$

Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad y la reproducibilidad se evaluaron mediante el análisis del nivel de mutación con $3 \times \text{LOD}$ en un entorno de ADN genómico nativo en tres centros de análisis, utilizando varios lotes de kits, usuarios y series durante distintos días, con dos réplicas de cada muestra. En los tres ensayos de mutación, el 100% de las muestras de ADN mutantes obtuvieron resultados positivos para la mutación. Las muestras nativas obtuvieron resultados negativos para la mutación en todos los ensayos de todos los centros.

Efecto de la concentración de ADN introducido

Este estudio se llevó a cabo a partir de ADN extraído de tejido FFPE. Para determinar el efecto de cambiar la concentración de ADN introducido en los resultados producidos por el kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR cercanos al LOD, se desarrolló un conjunto de muestras para todas las mutaciones mezclando ADN mutante sintético con ADN genómico nativo para producir muestras con niveles bajos, medios y altos de ADN introducido.

Los niveles altos y bajos de ADN introducido se utilizaron para representar el intervalo del valor de C_T (de 23,70 a 31,10) del ensayo de control.

Una valoración del conjunto de datos de ADN introducido (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 intervalo de funcionamiento del ensayo) no afecta al valor de ΔC_T ni a la mutación de una muestra.

Sustancias interferentes

Sustancias interferentes endógenas

Las posibles sustancias interferentes se añadieron a las muestras artificiales de plasma positivas para la mutación $3 \times \text{LOD}$. A continuación, las muestras se analizaron con el kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR. Las muestras que contenían posibles sustancias interferentes se compararon con las muestras artificiales de plasma positivas para la mutación $3 \times \text{LOD}$ que no contenían ninguna sustancia interferente añadida. Cada sustancia interferente se analizó con 4 réplicas.

Se consideró que una diferencia de $> 2 \times$ desviaciones estándar (SD) (tomada del estudio de la precisión) entre los valores de ΔC_T del "análisis" y el "control" (es decir, sin sustancia interferente) indicaba una posible interferencia. En estos casos, se proporciona la diferencia observada entre los valores de ΔC_T .

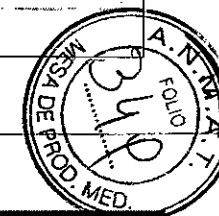
Las concentraciones de pruebas que se muestran en la tabla 11 se seleccionaron a partir de los *requerimientos EPO7-A2 del CLSI* y representan las concentraciones máximas esperadas en una muestra clínica.

Nota: estos compuestos endógenos se añadieron a muestras artificiales de plasma positivas para la mutación que contenían plasma de donantes sanos. Por lo tanto, los compuestos endógenos habrían estado presentes de forma natural en las muestras en concentraciones desconocidas antes de realizar la adición. La concentración final de cada una de las posibles sustancias interferentes endógenas analizadas posiblemente sea mayor que la concentración de la prueba.

Tabla 11. Posibles sustancias endógenas interferentes

Posibles sustancias interferentes (SI)	Concentración de la prueba
Bilirrubina no conjugada	150 mg/dl
Hemoglobina (humana)	2 g/dl
Triglicéridos	3 g/dl

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



7065

Ensayo T790M

Los siguientes compuestos endógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 11 resultaron tener un efecto $> 2 \times SD$ (ΔC_T de 0,40) en el rendimiento del ensayo T790M:

- Triglicéridos, diferencia de ΔC_T de 1,37

Ensayo de deleciones

Los siguientes compuestos endógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 11 resultaron tener un efecto $> 2 \times SD$ (ΔC_T de 0,71) en el rendimiento del ensayo de deleciones:

- Hemoglobina, diferencia de ΔC_T de 0,80

Ensayo L858R

Los siguientes compuestos endógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 11 resultaron tener un efecto $> 2 \times SD$ (ΔC_T de 0,56) en el rendimiento del ensayo L858R:

- Bilirrubina, diferencia de ΔC_T de 1,13
- Triglicéridos, diferencia de ΔC_T de 1,53

Sustancias interferentes exógenas

Las posibles sustancias interferentes se añadieron a las muestras artificiales de plasma positivas para la mutación $3 \times LOD$. A continuación, las muestras se analizaron con el kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR. Las muestras que contenían posibles sustancias interferentes se compararon con las muestras artificiales de plasma positivas para la mutación $3 \times LOD$ que no contenían ninguna sustancia interferente añadida. Cada sustancia interferente se analizó con 4 réplicas.

Se consideró que una diferencia de $> 2x$ desviaciones estándar (tomada del estudio de la precisión) entre el valor de ΔC_T del "análisis" y el valor de ΔC_T del "control" (es decir, sin sustancia interferente) indicaba una posible interferencia. En estos casos, se proporciona la diferencia observada entre los valores de ΔC_T .

Las concentraciones de pruebas que se muestran en la tabla 12 se seleccionaron a partir de los requerimientos EPO7-A2 del CLSI y exceden la concentración terapéutica en todos los casos.

Tabla 12. Posibles sustancias exógenas interferentes

Posibles sustancias interferentes (SI)	Concentración de la prueba ($\mu\text{g/ml}$)
Hidrobromuro de citalopram	0,75
Hemihidrato de hidrocloreto de paroxetina	1,14
Hidrocloreto de sertralina	0,67
Hidrocloreto de fluoxetina	3,87
Acetaminofeno	200,7
K2 EDTA	3.600

Ensayo T790M

Los siguientes compuestos exógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 12 resultaron tener un efecto $> 2 \times SD$ (ΔC_T de 0,40) en el rendimiento del ensayo T790M:

- Hidrobromuro de citalopram, diferencia de ΔC_T de 0,52
- Hidrocloreto de sertralina, diferencia de ΔC_T de 0,47
- Hidrocloreto de fluoxetina, diferencia de ΔC_T de 0,48

Ensayo de deleciones

Los siguientes compuestos exógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 12 resultaron tener un efecto $> 2 \times SD$ (ΔC_T de 0,71) en el rendimiento del ensayo de deleciones:

- Fluoxetina, diferencia de ΔC_T de 0,73

Ensayo L858R

Los siguientes compuestos exógenos con las concentraciones indicadas en la tabla 12 resultaron tener un efecto $> 2 \times SD$ (ΔC_T de 0,56) en el rendimiento del ensayo L858R:

- Hidrobromuro de citalopram, diferencia de ΔC_T de 0,72
- Hemihidrato de hidrocloreto de paroxetina, diferencia de ΔC_T de 0,92
- Hidrocloreto de sertralina, diferencia de ΔC_T de 0,82
- Hidrocloreto de fluoxetina, diferencia de ΔC_T de 0,98
- Acetaminofeno, diferencia de ΔC_T de 0,81
- K2-EDTA, diferencia de ΔC_T de 0,57

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

Rendimiento clínico

El ensayo clínico NCT01203917 era un estudio abierto de fase IV y de grupo único para evaluar la eficacia y la seguridad/tolerabilidad del gefitinib como tratamiento primario en pacientes caucásicos en fase IIIA/B/IV positivos para la mutación de EGFR con NSCLC.

Se determinó la idoneidad de los pacientes para someterse al ensayo clínico NCT01203917 mediante la presencia de mutaciones sensibilizadas de EGFR. Se evaluó el estado de la mutación de EGFR de los pacientes con NSCLC a partir de un ensayo de pruebas clínicas (CTA) con ADN proveniente de muestras de plasma y tejido emparejadas. El estudio incluía un objetivo exploratorio de biomarcador previamente planeado para establecer si se podrían utilizar muestras de plasma para realizar el análisis de mutación en caso de que no existan muestras de tejido disponibles. Los resultados detectaron altas tasas de concordancia entre las muestras de plasma y tejido emparejadas, un 94,3%, con una especificidad del ensayo del 99,8% y una sensibilidad del 65,7%.¹















Se llevaron a cabo pruebas retrospectivas de muestras de plasma obtenidas de pacientes sometidos al cribado del ensayo clínico NCT01203917 con el kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR. Se realizó un estudio puente para evaluar la concordancia del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR con el CTA utilizado en la selección de los pacientes del ensayo clínico NCT01203917. Esto permitió demostrar la equivalencia entre el CTA y el kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR.

Referencias

1. Douillard, J.Y., et al. [2014]. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. Br J Cancer 110(1), 55.

Símbolos

Los símbolos siguientes pueden aparecer en el embalaje y las etiquetas:

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

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



7065

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 con uno de los departamentos del servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Apéndice A: 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 13. Lista de mutaciones e identificadores COSMIC

Mutación	Exón	Cambio de base	ID COSMIC
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
		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
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (complejo)	12422
Deleciones	19	2238_2252>GCA (complejo)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		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

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

Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: 1 ensayo de control, 7 ensayos de mutaciones, control positivo, enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa	870311
Rotor-Gene Q y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx Splex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de melting de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador 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 melting de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de melting de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9001650

Producto	Contenido	Referencia
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de melting de alta resolución (HRM) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador 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
Productos relacionados		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Para 50 extracciones: columnas QIAamp Mini, extensor de tubos (20 ml), proteinasa K de QIAGEN, ARN transportador, tampones, VacConnectors y tubos de recogida (1,5 ml y 2 ml)	55114

7065

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



Marcas comerciales: QIAGEN®, iQerascreeen®, Rotor-Gene®, Pyro®, ARMS®, Scorpions®, Taq® (Grupo QIAGEN); IRESSA® (Grupo AstraZeneca).

Acuerdo de licencia limitada para el kit iQerascreeen EGFR Plasma RQO PCR

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos.

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para otros usuarios. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni sus(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit 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 de los kits 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 costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitado 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.

Dic-14 HB-1898 © 2014 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Australia = techservice-au@qiagen.com

Austria = techservice-at@qiagen.com

Belgium = techservice-bnl@qiagen.com

Brazil = suportetecnico.brasil@qiagen.com

China = techservice-cn@qiagen.com

Denmark = techservice-nordic@qiagen.com

Finland = techservice-nordic@qiagen.com

France = techservice-fr@qiagen.com

Germany = techservice-de@qiagen.com

Hong Kong = techservice-hk@qiagen.com

India = techservice-india@qiagen.com

Ireland = techservice-uk@qiagen.com

Italy = techservice-it@qiagen.com

Japan = techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) = techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg = techservice-bnl@qiagen.com

Mexico = techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands = techservice-bnl@qiagen.com

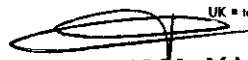
Norway = techservice-nordic@qiagen.com

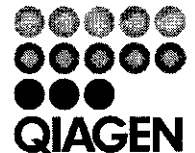
Singapore = techservice-sg@qiagen.com

Sweden = techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland = techservice-ch@qiagen.com

UK = techservice-uk@qiagen.com


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



7 0 6 5



1. RÓTULOS EXTERNOS

therascreen[®]
EGFR Plasma RGQ PCR Kit ▽ 24, V1

REF 870311 **CONT** 10 tubes

IVD **CE**

1 0 8 3 0 9 8 1 8 1 2 3 1 1 5 1 2 3 4 5 6 7

therascreen[®]
EGFR Plasma RGQ PCR Kit ▽ 24, V1

GTIN 04053228002178
LOY 1151234567
EXP 2018-12-31
MAT 1083098

-30°C **-15°C**

QIAGEN Manchester Ltd. Skelton House, Lloyd Street North,
 Manchester, M15 6SH, UK Tel: +44 (0) 808 234 3986

E

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

[Handwritten mark]

7065



therascreen[®]
EGFR Plasma RGQ PCR Kit 24, V1

COMP	NUM x CONT	MAT
EGFR Control Reaction Mix	2 x 600 µl	1073405
EGFR T790M Reaction Mix	1 x 600 µl	1073407
EGFR Del. Reaction Mix	1 x 600 µl	1073410
EGFR L858R Reaction Mix	1 x 600 µl	1073413
EGFR Positive Control	1 x 300 µl	1073428
Taq DNA Polymerase	2 x 80 µl	1075058
Water for NTC	1 x 1.9 ml	1067627
Water for sample dilution	1 x 1.9 ml	1067630

Para uso Diagnóstico *In Vitro*

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

DIRECTOR TÉCNICO: Bioq. Marisol Masino (M.N. 9483).

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

AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD – A.N.M.A.T.

CERTIFICADO N°:

DISPOSICIÓN N°:

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

Página 2 de 3



2. RÓTULOS EXTERNOS

MAT 1073405
 EGFR Control
 Reaction Mix
 600 µl [LOT] XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073407
 EGFR T790M
 Reaction Mix
 600 µl [LOT] XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073410
 EGFR Deletions
 Reaction Mix
 600 µl [LOT] XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073413
 EGFR L858R
 Reaction Mix
 600 µl [LOT] XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1073428
 EGFR
 Positive Control
 300 µl [LOT] XXXXXXXXXX
 2012-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN Manchester Ltd.

MAT 1075058
 Taq
 DNA Polymerase
 80 µl [LOT] XXXXXXXXXX
 2014-12-31 -15°C
 -30°C
 QIAGEN GmbH Hilden

MAT 1067627
 Water for NTC
 1.9 ml
 2012-12-31 -15°C
 -25°C
 [LOT] XXXXXXXXXX
 QIAGEN

MAT 1067630
 Water for sample
 dilution
 1.9 ml
 2012-12-31 -15°C
 -25°C
 [LOT] XXXXXXXXXX
 QIAGEN

MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA - M.N. 9483
 DT - TECNOLAB 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 1-47-3110-1177/16-1

Se autoriza a la firma TECNOLAB S.A. a importar y comercializar los Productos para diagnóstico de uso in vitro denominados 1) *therascreen* EGFR RGQ PCR kit versión 2 (V2) / ENSAYO DISEÑADO 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 JUNTO AL SOFTWARE *therascreen* EGRF CE Assay Package, A PARTIR DE MUESTRAS DE ADN OBTENIDAS DE TEJIDO DE CANCER DE PULMÓN NO MICRICÍTICO (NSCLC) FIJADO EN FORMALINA E INCLUIDO EN PARAFINA (FFPE); 2) *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR/ ENSAYO DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN DE DELECCIONES DEL EXÓN 19 Y SUSTITUCIONES EN LOS EXONES 20 Y 21 EN EL GEN EGFR, COMO AYUDA EN LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON CANCER DE PULMÓN NO MICRICÍTICO (NSCLC), CUANDO NO ES POSIBLE REALIZAR LA EVALUACIÓN CON UNA MUESTRA DE TEJIDO, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN EL INSTRUMENTO Rotor-Gene Q.-----

PRESENTACIÓN: 1) y 2) ENVASES POR 24 DETERMINACIONES, CONTENIENDO

	1) <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR kit versión 2	2) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR
Control Reaction Mix	2 viales x 600 µl	2 viales x 600 µl
T790M Reaction Mix	600 µl	600 µl

Deletions Reaction mix	600 µl	600 µl
L858R Reaction Mix	600 µl	600 µl
L861Q Reaction Mix	600 µl	--
G719X Reaction Mix	600 µl	--
S768I Reaction Mix	600 µl	--
Insertions Reaction Mix	600 µl	--
EGFR Positive Control	300 µl	300 µl
Taq DNA Polymerase	2 viales x 80 µl	2 viales x 80 µl
Agua exenta de nucleasas para el control sin molde	1, 9 ml	1, 9 ml
Agua exenta de nucleasas para la dilución	1, 9 ml	1, 9 ml

Vida útil: 1) SEIS (6) meses desde la fecha de elaboración conservado entre -15 y -30 °C; 2) DOCE (12) meses desde la fecha de elaboración conservado entre -15 y -30 °C . Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley N° 16.463 y Resolución Ministerial N° 145/98. Lugar de elaboración: 1) y 2) QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, (ALEMANIA) para 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

n° **008450**



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

//..

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA
MEDICA

Buenos Aires, 30 JUN 2016

Firma y sello

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