



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Disposición

Número:

Referencia: EX-2021-56396600-APN-DGA#ANMAT

VISTO el N° EX-2021-56396600-APN-DGA#ANMAT 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 del Producto médico para diagnóstico *in vitro* denominado **AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit**.

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

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico que establece que el producto reúne las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia y corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico para diagnóstico *in vitro* objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

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

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico *in vitro* denominado: **AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit** de acuerdo con lo solicitado por la firma TECNOLAB S.A., con los Datos Identificatorios Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulos y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2022-45634617-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM 1252-206”, con exclusión de toda otra leyenda no autorizada y/o contemplada en la normativa vigente.

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

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica a los nuevos productos. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

NOMBRE COMERCIAL: AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit 8.01.20201X024F; 24 pruebas (para Rotor-Gene Q/6000) 8.01.20201X024E; 24 pruebas (para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, ABI StepOnePlus, LightCycler 480, Bio-Rad CFX96, SLAN-96S). 8.01.20201W010A; 10 pruebas (para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT). 8.01.20201W010B; 10 pruebas (para LightCycler480, Bio-Rad CFX96). 8.01.20201W010D; 10 pruebas (para SLAN-96S).

INDICACION DE USO: ensayo de PCR a Tiempo Real para la detección cualitativa de 29 mutaciones somáticas en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR en ADN genómico humano extraído de muestras de tejido tumoral fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE), o ADN circulante extraído de plasma/suero. El kit está diseñado para evaluar el estado de la mutación de EGFR en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y ayudar a identificar a los pacientes que pueden responder al tratamiento con un EGFR-TKI: inhibidor de la tirosina quinasa (TKI) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

FORMA DE PRESENTACIÓN: 8.01.20201X024F; 24 pruebas (para Rotor-Gene Q/6000) El kit está compuesto por nueve viales con mezcla de reacción (Reaction Mix), un vial con enzimas de reacción (EGFR Enzyme Mix) y un control Positivo (EGFR Positive Control) según se detalla a continuación: 1. 19-Del Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 2. L858R Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 3. T790M Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 4. Insertions Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo

cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 5. G719A/G719C Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 6. G719S Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 7. S768I Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 8. L861Q Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 9. External Control Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. EGFR Positive Control: un vial con 500 µL conteniendo plásmido de ADN (gen recombinante con mutaciones de EGFR) como control positivo. 10. EGFR Enzyme Mix: un vial con 80 µL conteniendo de enzimas ADN Taq polimerasa y uracil-Nglicosilasa. 11. 8.01.20201X024E; 24 pruebas (para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, ABI StepOnePlus, LightCycler 480, Bio-Rad CFX96, SLAN-96S). El kit está compuesto por ocho viales con mezcla de reacción (Reaction Mix), un vial con enzimas de reacción (EGFR Enzyme Mix) y un control Positivo (EGFR Positive Control) según se detalla a continuación: 1. 19-Del Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 2. L858R Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 3. T790M Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 4. Insertions Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 5. G719X Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 6. S768I Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 7. L861Q Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 8. External Control Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. EGFR Enzyme Mix: un vial con 85 µL conteniendo de enzimas ADN Taq polimerasa y uracil-Nglicosilasa. 9. EGFR Positive Control: un vial con 500 µL conteniendo plásmido de ADN (gen recombinante con mutaciones de EGFR) como control positivo. 10. 8.01.20201W010A; 10 pruebas (para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT). 8.01.20201W010B; 10 pruebas (para LightCycler480, Bio-Rad CFX96). 8.01.20201W010D; 10 pruebas (para SLAN-96S). Estos kits están compuestos por: 1) EGFR Reaction Mix: 12 tiras de 8 pocillos* conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. Cada tira (8- pocillos) incluye el siguiente contenido para analizar una muestra o un control (Tabla 1) * 2) EGFR Positive Control: un vial por 250 µl conteniendo Control Positivo para EGFR (plásmido de ADN). 3) EGFR Enzyme Mix: un vial por 45 µl conteniendo enzima ADN Taq polimerasa y uracil-N-glicosilasa.

PERÍODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE PRESENTACIÓN: 12 (DOCE) meses. Todo el contenido del kit debe almacenarse inmediatamente después de su recepción a -20 ± 5 °C y protegerse de la luz.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: Amoy Diagnostics Co., Ltd. (39 Dingshan Road, Haicang District, Xiamen 361027, China.

CONDICIÓN DE VENTA/CATEGORÍA: Venta exclusiva a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Nº EX-2021-56396600-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by GARAY Valeria Teresa
Date: 2022.08.04 13:33:52 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires


Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.08.04 13:34:11 -03:00






PROYECTO DE RÓTULOS EXTERNOS - AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit



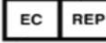
Código: 8.01.20201X024F (24 pruebas) - Para Rotor-Gene Q/ 6000 (72 pocillos).


AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit ADx-ARMS®
Real-time PCR

REF 8.01.20201X024F  (01) 06959094206024
LOT XXXXXXXXXXXXX (17) 900131
1990-01-31 (10) XXXXXXXXXXXXX
(21) 290873

ADx-EG07-RG72
For Rotor-Gene Q(72wells), Rotor-Gene 6000(72wells)

 24 
 -15°C
-25°C

 
 Qarad EC-REP BV
Pas 257,
2440 Geel, Belgium

 **Amoy Diagnostics Co., Ltd.**
39 Dingshan Road, Haicang District,
Xiamen 361027, P. R. China
Tel: (86)592-6806835
Fax: (86)592-6806839
Web: www.amoydx.com
Email: info@amoydx.com

IMPORTADOR: TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Argentina.
DIRECTOR TECNICO: Bioq. Marisol Masino.
ORIGEN DE ELABORACION: Amoy Diagnostics Co., LTD (China).
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO- VENTA A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS
APROBADO POR A.N.M.A.T. CON PM-1252-206


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



Código: 8.01.20201X024E (24 pruebas) - Para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, ABI StepOnePlus, LightCycler 480, Bio-Rad CFX96, SLAN-96S

AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit ADx-ARMS®
Real-time PCR

REF 8.01.20201X024E
LOT XXXXXXXXXXXXX
1990-01-31




(01) 06959094206024
(17) 900131
(10) XXXXXXXXXXXXX
(21) 190445

ADx-EG07
For Mx3000P,ABI7300,ABI7500,ABI7900HT,
CFX96,StepOne Plus,LC480,SLAN

Σ 24 ⓘ
-25°C -15°C

CE IVD
EC REP Qarad EC-REP BV
Pas 257,
2440 Geel, Belgium



Amoy Diagnostics Co., Ltd.
39 Dingshan Road, Haicang District,
Xiamen 361027, P. R. China
Tel: (86)592-6806835
Fax: (86)592-6806839
Web: www.amoydx.com
Email: info@amoydx.com

IMPORTADOR: TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Argentina.

DIRECTOR TECNICO: Bioq. Marisol Masino.

ORIGEN DE ELABORACION: Amoy Diagnostics Co., LTD (China).

USO PROFESIONAL EXCLUSIVO- VENTA A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS

APROBADO POR A.N.M.A.T. CON PM-1252-206



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

Director Técnico
Firma y Sello



Código: 8.01.20201W010A (10 pruebas) - Para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT

ADx-ARMS®

AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit

Real-time PCR

REF 8.01.20201W010A

LOT XXXXXXXXXXXXX

 1990-01-31

ADx-EG01

For Mx3000P,ABI7300,ABI7500,ABI7900HT




(01) 06959094206017
(17) 900131
(10) XXXXXXXXXXXXX
(21) 136317

 10 

 -15°C
-25°C

  Qarad EC-REP BV
Pas 257,
2440 Geel, Belgium



Amoy Diagnostics Co., Ltd.
39 Dingshan Road, Haicang District,
Xiamen 361027, P. R. China
Tel: (86)592-6806835
Fax: (86)592-6806839
Web: www.amoydx.com
Email: info@amoydx.com

IMPORTADOR: TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Argentina.
DIRECTOR TECNICO: Bioq. Marisol Masino.
ORIGEN DE ELABORACION: Amoy Diagnostics Co., LTD (China).
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO- VENTA A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS
APROBADO POR A.N.M.A.T. CON PM-1252-206

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

Director Técnico
Firma y Sello



Código: 8.01.20201W010B (10 pruebas) - Para LightCycler480, Bio-Rad CFX96

AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit ADx-ARMS®
Real-time PCR

REF 8.01.20201W010B
LOT XXXXXXXXXXXXX
1990-01-31




(01) 06959094206017
(17) 900131
(10) XXXXXXXXXXXXX
(21) 961070

ADx-EG01
For LC480,CFX96

Σ 10 ⓘ
-25°C -15°C

CE **IVD**
EC REP
Qarad EC-REP BV
Pas 257,
2440 Geel, Belgium



Amoy Diagnostics Co., Ltd.
39 Dingshan Road, Haicang District,
Xiamen 361027, P. R. China
Tel: (86)592-6806835
Fax: (86)592-6806839
Web: www.amoydx.com
Email: info@amoydx.com

IMPORTADOR: TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Argentina.

DIRECTOR TECNICO: Bioq. Marisol Masino.

ORIGEN DE ELABORACION: Amoy Diagnostics Co., LTD (China).

USO PROFESIONAL EXCLUSIVO- VENTA A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS

APROBADO POR A.N.M.A.T. CON PM-1252-206



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

Director Técnico
Firma y Sello



Código: 8.01.20201W010D (10 pruebas) - Para SLAN-96S

AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit ADx-ARMS®
Real-time PCR

REF 8.01.20201W010D
LOT XXXXXXXXXXXXX
1990-01-31




(01) 06959094206017
(17) 900131
(10) XXXXXXXXXXXXX
(21) 424250

ADx-EG01
For SLAN

10

-25°C -15°C

CE **IVD**
EC REP Qarad EC-REP BV
Pas 257,
2440 Geel, Belgium



Amoy Diagnostics Co., Ltd.
39 Dingshan Road, Haicang District,
Xiamen 361027, P. R. China
Tel: (86)592-6806835
Fax: (86)592-6806839
Web: www.amoydx.com
Email: info@amoydx.com

IMPORTADOR: TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Argentina.

DIRECTOR TECNICO: Bioq. Marisol Masino.

ORIGEN DE ELABORACION: Amoy Diagnostics Co., LTD (China).

USO PROFESIONAL EXCLUSIVO- VENTA A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS

APROBADO POR A.N.M.A.T. CON PM-1252-206



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

Director Técnico
Firma y Sello



PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS

Código: 8.01.20201X024F (24 pruebas) - Para Rotor-Gene Q/ 6000 (72 pocillos).

<p>19-Del 反应混合液 19-Del Reaction Mix</p> <p>规格Quantity: 700 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>	<p>T790M 反应混合液 T790M Reaction Mix</p> <p>规格Quantity: 700 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>
<p>L858R 反应混合液 L858R Reaction Mix</p> <p>规格Quantity: 700 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>	<p>20-Ins 反应混合液 Insertions Reaction Mix</p> <p>规格Quantity: 700 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>
<p>G719A/G719C 反应混合液 G719A/G719C Reaction Mix</p> <p>规格Quantity: 700 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>	<p>S768I 反应混合液 S768I Reaction Mix</p> <p>规格Quantity: 700 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>
<p>G719S 反应混合液 G719S Reaction Mix</p> <p>规格Quantity: 700 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>	<p>L861Q 反应混合液 L861Q Reaction Mix</p> <p>规格Quantity: 700 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>
<p>外控反应混合液 External Control Reaction Mix</p> <p>规格Quantity: 700 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>	
<p>Taq酶(EGFR) EGFR Enzyme Mix</p> <p>规格Quantity: 80 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>	<p>EGFR 阳性质控品 EGFR Positive Control</p> <p>规格Quantity: 500 µL</p> <p>批号 LOT 011160624002</p> <p>AmoyDx®</p> <p>有效期至 2017-08-03</p>

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

Director Técnico
Firma y Sello



Código: 8.01.20201X024E (24 pruebas) - Para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, ABI StepOnePlus, LightCycler 480, Bio-Rad CFX96, SLAN-96S

19-Del 反应混合液
19-Del Reaction Mix

AmoyDx®

规格Quantity: 1000 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

20-Ins 反应混合液
Insertions Reaction Mix

AmoyDx®

规格Quantity: 1000 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

L858R 反应混合液
L858R Reaction Mix

AmoyDx®

规格Quantity: 1000 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

G719X 反应混合液
G719X Reaction Mix

AmoyDx®

规格Quantity: 1000 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

T790M 反应混合液
T790M Reaction Mix

AmoyDx®

规格Quantity: 1000 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

S768I 反应混合液
S768I Reaction Mix

AmoyDx®

规格Quantity: 1000 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

L861Q 反应混合液
L861Q Reaction Mix

AmoyDx®

规格Quantity: 1000 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

外控反应混合液
External Control Reaction Mix

AmoyDx®

规格Quantity: 1000 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

Taq酶(EGFR)
EGFR Enzyme Mix

AmoyDx®

规格Quantity: 85 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

EGFR 阳性质控品
EGFR Positive Control

AmoyDx®

规格Quantity: 500 µL

批号 **LOT** 011160624002

有效期至 2017-08-03

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

Director Técnico
Firma y Sello



Código: 8.01.20201W010A (10 pruebas) - Para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT
Código: 8.01.20201W010B (10 pruebas) - Para LightCycler480, Bio-Rad CFX96
Código: 8.01.20201W010D (10 pruebas) - Para SLAN-96S



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

Director Técnico
Firma y Sello



AmoyDx[®] EGFR 29 Mutations Detection Kit

Detección de 29 mutaciones en los exones 18-21

Instrucción de Uso

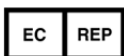
REF 8.01.20201X024F 24 pruebas Para Rotor-Gene Q/ 6000 (72 pocillos)



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



Amoy Diagnostics Co., Ltd.
39 Dingshan Road, Haicang District,
Xiamen 361027, P. R. China
Tel: +86 592 6806835
Fax: +86 592 6806839
Correo electrónico: sales@amoydx.com
Sitio web: <http://www.amoydx.com>



Qarad EC-REP BV
Pas 257,
2440 Geel, Bélgica

Versión: B3.4
Noviembre 2020

Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) juega un papel central en la transmisión de señales que promueven el crecimiento y la proliferación celular. Debido a su asociación con neoplasias malignas, el EGFR se ha convertido en el objetivo de una clase en expansión de terapias contra el cáncer, como gefitinib, erlotinib y afatinib, que son inhibidores de la tirosina quinasa (TKI). Los TKI se dirigen al dominio de tirosina quinasa EGFR. Estos medicamentos funcionan mejor en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) cuyo cáncer se debe a una señalización anormal del EGFR. Se ha descubierto que los pacientes con cáncer de pulmón que experimentaron respuestas rápidas, duraderas, completas o parciales a la terapia con TKI albergan mutaciones somáticas en el gen EGFR. Los pacientes con CPCNP con mutaciones sensibilizantes del EGFR tratados con terapia con TKI han mostrado una supervivencia sin progresión más prolongada y una tasa de respuesta más alta, en comparación con la quimioterapia convencional. La resistencia a la terapia con TKI, ya sea en el tumor primario o adquirida después del tratamiento con TKI, se asocia con la mutación EGFR T790M. Por lo tanto, la evaluación del estado de la mutación EGFR facilita el tratamiento personalizado de los pacientes con cáncer de pulmón.

Uso Previsto

El AmoyDx® *EGFR* 29 Mutations Detection Kit es un ensayo de PCR en tiempo real para la detección cualitativa de 29 mutaciones somáticas en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR en ADN genómico humano extraído de un tumor incrustado en parafina fijado con formalina (FFPE) tejido, o ADN circulante extraído de plasma / suero. El kit está diseñado para evaluar el estado de la mutación de EGFR en pacientes con NSCLC y ayudar a identificar a los pacientes que pueden responder al tratamiento con un EGFR-TKI.

El kit es para uso diagnóstico in vitro y está destinado a ser utilizado por profesionales capacitados en un entorno de laboratorio.

Principios del Procedimiento

El kit adopta la tecnología Amplification Refractory Mutation System (ARMS) que comprende cebadores específicos y sondas fluorescentes para detectar mutaciones genéticas en un ensayo de PCR en tiempo real. Durante la amplificación del ácido nucleico, el ADN mutante diana se empareja con las bases en el extremo 3' del cebador, se amplifica de manera selectiva y eficiente, luego el amplicón mutante se detecta mediante sondas fluorescentes marcadas con FAM. Si bien el ADN de tipo salvaje no se puede emparejar con cebadores específicos, no se produce ninguna amplificación.

El kit está compuesto por nueve Reaction Mixes, *EGFR* Enzyme Mix y *EGFR* Positive Control.

- 1) La **Reaction Mix en Tubos** ①~⑧ incluye detección de mutaciones y sistemas de control interno. El sistema de detección de mutaciones incluye cebadores y sondas marcadas con FAM específicos para mutaciones EGFR designadas, que se utilizan para detectar el estado de la mutación EGFR. El sistema de control interno contiene cebadores y una sonda marcada con HEX para una región de ADN genómico sin mutaciones conocidas ni polimorfismo, para detectar la presencia de inhibidores y monitorear la precisión de la operación experimental.
- 2) La **External Control Reaction Mix** contiene cebadores y una sonda marcada con FAM para una región de ADN genómico sin mutaciones ni polimorfismo conocidos, que se utiliza para evaluar la calidad del ADN.
- 3) El **EGFR Positive Control** (PC) contiene un gen recombinante con mutaciones de EGFR.
- 4) La **EGFR Enzyme Mix** contiene ADN polimerasa Taq para amplificación por PCR y uracil-N-glicosilasa que funciona a temperatura ambiente para evitar la contaminación por arrastre de amplicones de PCR.

Contenido del Kit

El kit contiene los siguientes materiales (Tabla 1).

Table 1 Kit Contents

No. de Tubo	Contenido	Ingredientes Principales	Cantidad	Señal Fluorescente
①	19-Del Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	700 µL/tube ×1	FAM, HEX
②	L858R Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	700 µL/tube ×1	FAM, HEX
③	T790M Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	700 µL/tube ×1	FAM, HEX
④	Insertions Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	700 µL/tube ×1	FAM, HEX
⑤	G719A/G719C Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	700 µL/tube ×1	FAM, HEX
⑥	G719S Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	700 µL/tube ×1	FAM, HEX
⑦	S768I Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	700 µL/tube ×1	FAM, HEX
⑧	L861Q Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	700 µL/tube ×1	FAM, HEX
⑨	External Control Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	700 µL/tube ×1	FAM
⑩	EGFR Positive Control 2	Plasmid DNA	500 µL/tube ×1	/
⑪	EGFR Enzyme Mix	Taq DNA Polymerase, Uracil-N-Glycosylase	80 µL/tube ×1	/



Almacenamiento y Estabilidad

El kit requiere el envío en frío. Todo el contenido del kit debe almacenarse inmediatamente después de su recepción a -20 ± 5 °C y protegerse de la luz.

La vida útil del kit es de doce meses. El número máximo de ciclos de congelación-descongelación es cinco.

Reactivos y Equipos Adicionales Requeridos pero No Suministrados

- 1) Instrumento de PCR en tiempo real compatible: Rotor-Gene Q / 6000 (72 pocillos).
- 2) Kit de extracción de ADN. Recomendamos utilizar el AmoyDx® FFPE DNA Kit (Cat No.: 8.02.23501X036G) para tejidos FFPE y el AmoyDx® Circulating DNA kit (Cat No.: 8.02.26201X024G) para muestras de plasma / suero.
- 3) Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN.
- 4) Mini centrífuga con rotor para tubos de centrifuga.
- 5) Mini centrífuga con rotor para tubos de PCR.
- 6) Tubos de centrifuga libres de nucleasas.
- 7) Tubos y tapas de PCR libres de nucleasas.
- 8) Pipetas ajustables y puntas de pipeta filtradas para manipular ADN.
- 9) Gradillas para tubos.
- 10) Guantes desechables sin polvo.
- 11) Agua estéril sin nucleasas.
- 12) 1 x TE buffer (pH 8,0).



Precauciones y Requisitos de Manipulación

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Precauciones

- Lea atentamente las instrucciones y familiarícese con todos los componentes del kit antes de usarlo, y siga estrictamente las instrucciones durante el funcionamiento.
- Compruebe los instrumentos de PCR en tiempo real compatibles antes de usarlos.
- NO use el kit ni ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- NO utilice ningún otro reactivo de diferentes lotes en las pruebas.
- NO use ningún otro reactivo de otros kits en las pruebas.

Información de Seguridad

- Manipule todas las muestras y componentes del kit como material potencialmente infeccioso utilizando procedimientos de laboratorio seguros.
- Solo profesionales capacitados pueden utilizar este kit. Utilice una bata de laboratorio adecuada y guantes desechables mientras manipula los reactivos.
- Evite el contacto de la piel, los ojos y las membranas mucosas con los productos químicos. En caso de contacto, enjuague con agua inmediatamente.
- NO pipetee con la boca.

Descontaminación y Desecho

- El kit contiene control positivo; distinga estrictamente el control positivo de otros reactivos para evitar la contaminación que puede causar falsos positivos.
- La amplificación por PCR es extremadamente sensible a la contaminación cruzada. El flujo de tubos, bastidores, pipetas y otros materiales utilizados debe ser desde la preamplificación hasta la posamplificación, y nunca hacia atrás.
- Deben usarse guantes y cambiarse con frecuencia al manipular muestras y reactivos para evitar la contaminación.
- Use pipetas separadas y dedicadas y puntas de pipeta con filtro al manipular muestras y reactivos para evitar la contaminación de ADN exógeno a los reactivos.
- Empaque los tubos posteriores a la amplificación con dos guantes desechables y deséchelos adecuadamente. NO abra los tubos de PCR

posteriores a la amplificación.

- Todos los materiales desechables son de un solo uso. NO reutilizar.
- Los reactivos no utilizados, el kit usado y los desechos deben eliminarse adecuadamente.

Limpieza

- Después del experimento, limpie el área de trabajo, rocíe las pipetas y el equipo con etanol al 75% o solución de ácido hipocloroso al 10%.

Configuración del Instrumento

- Configure el volumen de reacción a 25 µL.
- Antes de la operación, configure el programa de PCR siguiendo los siguientes pasos: ①seleccione “Gain Optimization”, se abrirá la ventana “Auto Gain Optimization Setup” (ver Figura 1); ②Haga clic en “Perform Calibration Before 1st Acquisition” y “Optimize Acquiring” (ver Figura 2). ③Haga clic en " OK ", luego haga clic en " Close" para continuar (ver Figura 3).

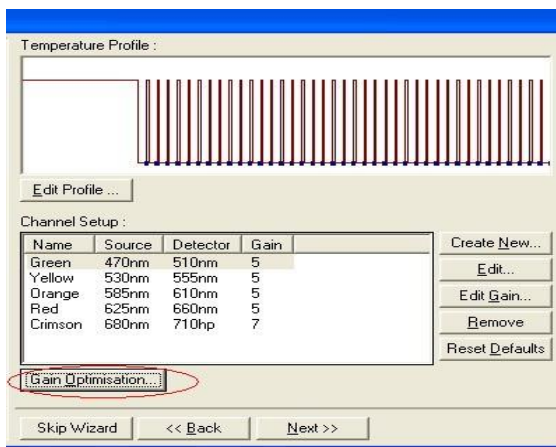


Figura 1

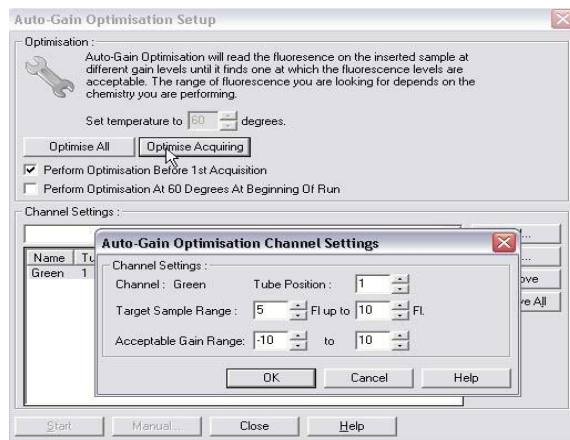


Figura 2

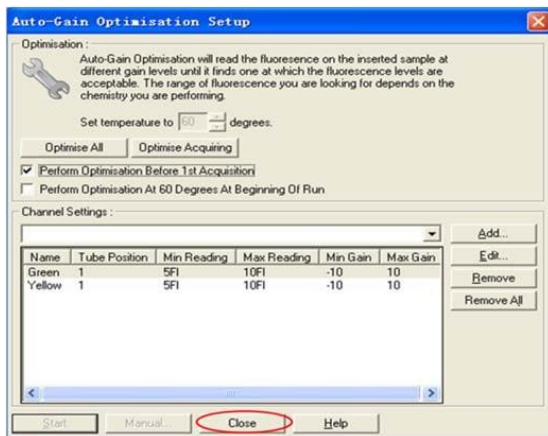


Figura 3



Procedimiento de Ensayo

1. Extracción de ADN

El material de la muestra debe ser ADN genómico humano extraído de tejido FFPE o muestras de plasma / suero. Los reactivos de extracción de ADN no están incluidos en el kit. Antes de la extracción de ADN, es fundamental utilizar una metodología patológica estándar para garantizar la calidad de la muestra del tumor. Realice la extracción de ADN según las instrucciones del kit de extracción de ADN.

Las muestras de tumores no son homogéneas, también pueden contener tejido no tumoral. Los datos de diferentes secciones de tejido del mismo tumor pueden ser inconsistentes. El ADN de tejido no tumoral puede no ser detectable con mutaciones de EGFR. Es mejor utilizar muestras de tejido tumoral con más del 30% de células tumorales.

El valor de DO₂₆₀ / DO₂₈₀ del ADN extraído de tejido FFPE debe estar entre 1.8 ~ 2.0 (medido con el espectrofotómetro, se recomienda el espectrofotómetro NanoDrop 1000/2000).

La cantidad de ADN extraído de tejido FFPE utilizado para la amplificación por PCR se muestra en la Tabla 2. Y el ADN circulante aislado del plasma / suero debe usarse directamente sin dilución.

Tabla 2 Concentración de ADN recomendada

Tejido	Tiempo de almacenamiento	Concentración de ADN	Cantidad de ADN por reacción
Muestra de FFPE	≤ 3 years	2~3 ng/μL	6~9 ng



Nota:

- El tejido FFPE debe manipularse y almacenarse correctamente. El tiempo de almacenamiento debe ser preferiblemente inferior a 3 años.
- Las muestras de plasma / suero deben obtenerse de sangre total periférica anticoagulada con EDTA.
- El ADN extraído debe utilizarse inmediatamente. Si no, debe almacenarse a -20 ± 5 °C durante no más de 3 meses.
- Antes de la detección, diluya el ADN de tejido extraído con $1 \times TE$ buffer (pH 8,0) hasta la concentración designada. Recomendamos usar al menos 5 μL de ADN para diluir 10 veces, para asegurar la validez de la concentración final.

2. Detección de Mutaciones

- 1) Saque las nueve **Reaction Mix**, **EGFR PC**, y **EGFR Enzyme Mix** del kit del congelador.
- 2) Descongele la **Reaction Mix** y **EGFR PC**, a temperatura ambiente. Cuando los reactivos se hayan descongelado por completo, invierta cada tubo 10 veces y centrifugue brevemente para recoger todo el líquido en el fondo del tubo.
- 3) Centrifugue brevemente la **EGFR Enzyme Mix** antes de usarla.
- 4) Prepare suficiente EGFR Master Mix que contenga cada Reaction Mix y EGFR Enzyme Mix respectivamente en un tubo de centrifuga estéril separado según la proporción de la Tabla 3. Mezcle cada EGFR Master Mix cuidadosamente pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo durante más de 10 veces y centrifugue brevemente.

Tabla 3 Master Mix

EGFR Master Mix	Volumen por prueba	
	Reaction Mix (μL)	Enzyme Mix (μL)
19-Del Master Mix	22	0.2
L858R Master Mix	22	0.16
T790M Master Mix	22	0.2
Insertions Master Mix	22	0.16
G719A/G719C Master Mix	22	0.2
G719S Master Mix	22	0.2
S768I Master Mix	22	0.16
L861Q Master Mix	22	0.16
External Control Master Mix	22	0.16

Nota:

- Cada ejecución de PCR debe contener una PC (control positivo) y un NTC (sin control de plantilla).
- No agite la mezcla de enzimas ni ninguna mezcla con la mezcla de enzimas.
- Las mezclas preparadas deben usarse inmediatamente, evite el almacenamiento prolongado.

- Debido a la viscosidad de la mezcla de enzimas, pipetee lentamente para asegurarse de que toda la mezcla se dispense completamente desde la punta.
 - Pipetee la mezcla de enzimas colocando la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra con un exceso de enzima.
- 5) Extraiga la muestra de ADN (véase la Tabla 2 para ver la concentración de ADN) y el agua sin nucleasas para NTC.
 - 6) Prepare 9 tubos de PCR para NTC: dispense 22 µL de cada EGFR Master Mix en cada tubo de PCR, respectivamente, luego agregue 3 µL de NTC a cada tubo de PCR y tape los tubos de PCR.
 - 7) Prepare 9 tubos de PCR para cada muestra: dispense 22 µL de cada EGFR Master Mix en cada tubo de PCR respectivamente, luego agregue 3 µL de cada muestra de ADN a cada tubo de PCR y tape los tubos de PCR.
 - 8) Prepare 9 tubos de PCR para PC: dispense 22 µL de cada EGFR Master Mix en cada tubo de PCR respectivamente, luego agregue 3 µL de PC a cada tubo de PCR de tira de PC y tape los tubos de PCR.
 - 9) Centrifugue brevemente los tubos de PCR para recoger todo el líquido en el fondo de cada tubo de PCR.
 - 10) Coloque los tubos de PCR en el instrumento de PCR en tiempo real.
 - 11) Configure el protocolo de PCR utilizando los parámetros de ciclo de la Tabla 4.

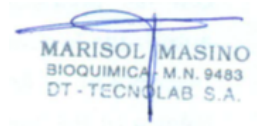


Tabla 4 Parámetros de Ciclos

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Dato Colección
1	1	95°C	2.5min	/
		95°C	8s	/
2	15	64°C	10s	/
		72°C	8s	/
		95°C	2s	/
3	31	60°C	15s	Verde / Amarillo
		72°C	8s	/

- 12) Comience la ejecución de la PCR inmediatamente.
- 13) Cuando finalice la ejecución de la PCR, analice los datos de acuerdo con los procedimientos de "Interpretación de Resultados".

3. Interpretación de Resultados

Antes del análisis de los datos de mutación, se deben verificar los siguientes elementos:

- 1) Para NTC: Los valores FAM Ct de los Tubos ①~⑧ deben ser ≥ 31 . Si no, los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 2) Para PC: Los valores FAM Ct de los tubos ①~⑨ y los valores HEX Ct de los tubos ①~⑧ deben ser < 21 . Si no es así, los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 3) Para el ensayo de control interno en Tubos ①~⑧ para cada muestra: Los valores HEX Ct deben ser < 31 . Si no, verifique las señales de FAM mutante en los Tubos ①~⑧:
 - a) Si el valor de Ct de FAM mutante es < 31 , continuar con el análisis.
 - b) Si el valor de Ct de FAM mutante es ≥ 31 , los datos son INVÁLIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 4) Para el ensayo de control externo en el tubo ⑨ para cada muestra:
 - a) El valor de FAM Ct debe estar entre 10 ~ 19.
 - b) Si el valor de FAM Ct es < 10 , esto indica que el ADN está sobrecargado. La cantidad de ADN debe reducirse y volverse a analizar. Pero si los valores de FAM Ct en los tubos ①~⑧ están en el rango de Ct negativo (véase la Tabla 5), la muestra se determina como negativa.
 - c) Si el valor de FAM Ct es > 19 , esto indica la degradación del ADN o la presencia de inhibidores de la PCR, o cualquier error en la operación experimental. La muestra debe volver a analizarse con ADN aumentado o extraído nuevamente. Pero si el resultado en cualquiera de los tubos ①~⑧ es positivo, la muestra se determina como positiva.

Analyze the mutation assay for each sample: Analice el ensayo de mutación para cada muestra:

- 5) Registre el valor FAM Ct en Tubos ①~⑧ para cada muestra.
- 6) Verifique los valores de Ct de FAM mutante en los tubos ①~⑧ de acuerdo con la Tabla 5:
 - a) Si todos los valores de FAM Ct de los tubos ①~⑧ están en el rango de Ct Negativo o no hay amplificación, la muestra se determina como negativa o por debajo del LOD del kit.
 - b) Si cualquier valor de FAM Ct de los tubos ①~⑧ está en el rango de Ct aceptable, calcule el valor de ΔCt para cada mutación que muestre amplificación positiva.
 - i. **Valor de $\Delta Ct = \text{Valor Ct de FAM Mutante} - \text{Valor Ct de FAM Control Externo}$.**
 - ii. Si el valor de ΔCt es $<$ el valor de ΔCt de corte, la muestra se determina como positiva (Mutación detectada).
 - iii. Si el valor de ΔCt es \geq el valor de ΔCt de corte, la muestra se determina como negativa (Mutación no detectada) o debajo del LOD del kit.

Tabla 5 Determinación de Resultados

Mutation Assay	19-Del	L858R	T790M	Insertions	G719A/G719C	G719S	S768I	L861Q	Results
Acceptable Ct range	Ct $<$ 29	Ct $<$ 29	Ct $<$ 28	Ct $<$ 29	Ct $<$ 29	Ct $<$ 28	Ct $<$ 29	Ct $<$ 29	Positive: $\Delta Ct < \Delta Ct$ Cut-off, Negative: $\Delta Ct \geq \Delta Ct$ Cut-off.
ΔCt Cut-off value	13	14	12.5	13	13	13	12	12	
Negative Ct range	Ct \geq 29	Ct \geq 29	Ct \geq 28	Ct \geq 29	Ct \geq 29	Ct \geq 28	Ct \geq 29	Ct \geq 29	Negative or under the LOD*.

* LOD: límite de detección

Características de Presentación

- 1) Sensibilidad analítica:
El kit permite la detección de 1 ~ 2,5% de ADN mutante en un fondo de 97,5 ~ 99% de ADN normal a una cantidad de muestra de ADN de 10 ng.
- 2) Especificidad:
La especificidad del kit se estableció probando 10 controles de referencia negativos. La prueba dio resultados negativos y la tasa de concordancia negativa fue del 100%.
- 3) Exactitud:
La exactitud del kit se estableció probando 29 controles de referencia positivos. La prueba dio resultados positivos y la tasa de concordancia positiva fue del 100%.
- 4) Precisión:
La precisión del kit se estableció probando el control de referencia de precisión para 10 repeticiones; CV (coeficiente de variación) fue $\leq 5\%$.
- 5) Sustancia interferente:
En este estudio se evaluaron dos sustancias que interfieren con frecuencia, la hemoglobina y los triglicéridos. Se confirma que las concentraciones máximas potenciales: 15 mg / mL de hemoglobina y 37 mmol / L de triglicéridos no interferirían con el resultado de la prueba.















Limitaciones

- 1) El kit debe ser utilizado únicamente por personal especialmente capacitado en técnicas de PCR.
- 2) Los resultados se pueden utilizar para ayudar al diagnóstico clínico, combinados con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
- 3) El kit ha sido validado para su uso con ADN extraído de muestras de tejido y plasma / suero FFPE.
- 4) El kit solo puede detectar las 29 mutaciones de EGFR enumeradas en el apéndice.
- 5) Los resultados confiables dependen del procesamiento, transporte y almacenamiento adecuados de las muestras.
- 6) La muestra que contiene ADN degradado puede afectar la capacidad de la prueba para detectar la mutación EGFR.
- 7) Las muestras con resultado negativo (sin mutación detectada) pueden albergar mutaciones de EGFR no detectadas por este ensayo.
- 8) El ADN circulante extraído del plasma o suero con resultados negativos (sin mutación detectada) puede albergar una mutación de EGFR, que podría confirmarse con la detección de ADN de tejido coincidente.

Referencias

- Shama SV, Bell DW, Settleman J, *et al*; Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007,7(3):169-81.
- Ressel R, Moran T, Queralt C, *et al*; Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*, 2009,361(10):958-67.
- Mork Ts, Wu YL, Thongprasert S, *et al*; Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2009,361(10):947-57.
- Gazdar AF; Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N Engl J Med*, 2009, 361(10):1018-20.
- Dancey JE; Epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer. *Drugs*, 2007, 67(8):1125-38.
- Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, *et al*; EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2005, 352(8):786-92.
- Yasuda H., S kobayshi, Costa, D. B, *et al*. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol.* 2012, 13(1): e23-31.
- Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, *et al*; Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer*, 2007, 97(6): 778-784.
- Huang Z, Wang ZJ, Bai H, *et al*; The detection of EGFR mutation status in plasma is reproducible and can dynamically predict the efficacy of EGFR-TKI. *Thoracic Cancer*, 2012, 3(4): 334-340.

Simbolos

	Representante Autorizado en la Comunidad Europea		Dispositivo Médico de Diagnóstico in Vitro
	Fabricante		Número de Catalogo
	Número de Lote		Fecha de Caducidad
	Contiene Suficientes Reactivos para <n> Pruebas		Limitación de Temperatura
	Consultar Las Instrucciones de Uso		Mantener Seco
	La Dirección Arriba		Frágil, Manipular con Cuidado



Apéndice

Mutaciones de EGFR detectadas por el Kit

No. de Tubo	Reactivo	Exón	Mutación	Cambio de Base	Cosmic ID	No. de Tubo
①	19-Del Reaction Mix	19	E746_A750del (1)	2235_2249del15	6223	1%
			E746_A750del (2)	2236_2250del15	6225	1%
			L747_P753>S	2240_2257del18	12370	1%
			E746_T751>I	2235_2252>AAT(complex)	13551	2%
			E746_T751del	2236_2253del18	12728	1%
			E746_T751>A	2237_2251del15	12678	1%
			E746_S752>A	2237_2254del18	12367	1%
			E746_S752>V	2237_2255>T(complex)	12384	1%
			E746_S752>D	2238_2255del18	6220	1%
			L747_A750>P	2238_2248>GC(complex)	12422	1%
			L747_T751>Q	2238_2252>GCA(complex)	12419	1%
			L747_E749del	2239_2247del19	6218	1%
			L747_T751del	2239_2253del15	6254	2%
			L747_S752del	2239_2256del18	6255	1%
			L747_A750>P	2239_2248TTAAGAGAAG>C(complex)	12382	1%
L747_P753>Q	2239_2258>CA(complex)	12387	1%			

			L747_T751>S	2240_2251del12	6210	1%
			L747_T751del	2240_2254del15	12369	1%
			L747_T751>P	2239_2251>C(complex)	12383	1%
②	L858R Reaction Mix	21	L858R	2573T>G	6224	1%
③	T790M Reaction Mix	20	T790M	2369C>T	6240	2.5%
④	Insertions Reaction Mix	20	H773_V774insH	2319_2320insCAC	12377	1%
			D770_N771insG	2310_2311insGGT	12378	1%
			V769_D770insASV	2307_2308insGCCAGCGTG	12376	1%
⑤	G719A/G719C Reaction Mix	18	G719A	2156G>C	6239	1%
			G719C	2155G>T	6253	1%
⑥	G719S Reaction Mix		G719S	2155G>A	6252	2.5%
⑦	S768I Reaction Mix	20	S768I	2303G>T	6241	1%
⑧	L861Q Reaction Mix	21	L861Q	2582T>A	6213	1%





AmoyDx[®] EGFR 29 Mutations Detection Kit

Detección de 29 mutaciones en los exones 18-21

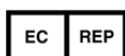
Instrucción de Uso

REF 8.01.20201X024E 24 pruebas

Para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT,
ABI StepOnePlus, LightCycler 480, cobas[®] z480,
Bio-Rad CFX96, SLAN-96S



Amoy Diagnostics Co., Ltd.
39 Dingshan Road, Haicang District,
Xiamen 361027, P. R. China
Tel: +86 592 6806835
Fax: +86 592 6806839
Correo electrónico: sales@amoydx.com
Sitio web: <http://www.amoydx.com>



Qarad EC-REP BV
Pas 257,
2440 Geel, Bélgica

Versión: B4.6
Abril 2021

Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) juega un papel central en la transmisión de señales que promueven el crecimiento y la proliferación celular. Debido a su asociación con neoplasias malignas, el EGFR se ha convertido en el objetivo de una clase en expansión de terapias contra el cáncer, como gefitinib, erlotinib y afatinib, que son inhibidores de la tirosina quinasa (TKI). Los TKI se dirigen al dominio de tirosina quinasa EGFR. Estos medicamentos funcionan mejor en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) cuyo cáncer se debe a una señalización anormal del EGFR. Se ha descubierto que los pacientes con cáncer de pulmón que experimentaron respuestas rápidas, duraderas, completas o parciales a la terapia con TKI albergan mutaciones somáticas en el gen EGFR. Los pacientes con CPCNP con mutaciones sensibilizantes del EGFR tratados con terapia con TKI han mostrado una supervivencia sin progresión más prolongada y una tasa de respuesta más alta, en comparación con la quimioterapia convencional. La resistencia a la terapia con TKI, ya sea en el tumor primario o adquirida después del tratamiento con TKI, se asocia con la mutación EGFR T790M. Por lo tanto, la evaluación del estado de la mutación EGFR facilita el tratamiento personalizado de los pacientes con cáncer de pulmón.

Uso Previsto

El AmoyDx® *EGFR* 29 Mutations Detection Kit es un ensayo de PCR en tiempo real para la detección cualitativa de 29 mutaciones somáticas en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR en ADN genómico humano extraído de un tumor incrustado en parafina fijado con formalina (FFPE) tejido, o ADN circulante extraído de plasma / suero. El kit está diseñado para evaluar el estado de la mutación de EGFR en pacientes con NSCLC y ayudar a identificar a los pacientes que pueden responder al tratamiento con un EGFR-TKI.

El kit es para uso diagnóstico in vitro y está destinado a ser utilizado por profesionales capacitados en un entorno de laboratorio.

Principios del Procedimiento

El kit adopta la tecnología Amplification Refractory Mutation System (ARMS) que comprende cebadores específicos y sondas fluorescentes para detectar mutaciones genéticas en un ensayo de PCR en tiempo real. Durante la amplificación del ácido nucleico, el ADN mutante objetivo se empareja con las bases en el extremo 3' del cebador, se amplifica de manera selectiva y eficiente, luego el amplicón mutante se detecta mediante sondas fluorescentes marcadas con FAM. Si bien el ADN de tipo salvaje no se puede emparejar con cebadores específicos, no se produce amplificación.

El kit está compuesto por ocho **Reaction Mixes**, **EGFR Enzyme Mix** y **EGFR Positive Control**.

- 1) La **Reaction Mix** en Tubos ①~⑦ incluye detección de mutaciones y sistemas de control interno. El sistema de detección de mutaciones incluye cebadores y sondas marcadas con FAM específicos para mutaciones EGFR designadas, que se utilizan para detectar el estado de la mutación EGFR. El sistema de control interno contiene cebadores y una sonda marcada con HEX para una región de ADN genómico sin mutaciones conocidas ni polimorfismo para detectar la presencia de inhibidores y controlar la precisión de la operación experimental.
- 2) La **External Control Reaction Mix** contiene cebadores y una sonda marcada con FAM para una región de ADN genómico sin mutaciones ni polimorfismo conocidos, que se utiliza para evaluar la calidad del ADN.
- 3) El **EGFR Positive Control** (PC) contiene un gen recombinante con mutaciones de EGFR.
- 4) La **EGFR Enzyme Mix** contiene ADN polimerasa Taq para amplificación por PCR y uracil-N-glicosilasa que funciona a temperatura ambiente para evitar la contaminación por arrastre de amplicones de PCR.

Contenido del Kit

El kit contiene los siguientes materiales:

Tabla 1 Contenido del Kit

No. de Tubo	Contenido	Ingredientes Principales	Cantidad	Señal Fluorescente
①	19-Del Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	1000 µL/tubo ×1	FAM, HEX/VIC
②	L858R Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	1000 µL/tubo ×1	FAM, HEX/VIC
③	T790M Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	1000 µL/tubo ×1	FAM, HEX/VIC
④	Insertions Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	1000 µL/tubo ×1	FAM, HEX/VIC
⑤	G719X Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	1000 µL/tubo ×1	FAM, HEX/VIC
⑥	S768I Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	1000 µL/tubo ×1	FAM, HEX/VIC
⑦	L861Q Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	1000 µL/tubo ×1	FAM, HEX/VIC

⑧	External Control Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	1000 µL/tube ×1	FAM
/	EGFR Enzyme Mix	Taq DNA Polymerase, Uracil-N-Glycosylase	85 µL/tube ×1	/
/	EGFR Positive Control	Plasmid DNA	500 µL/tube ×1	/

Almacenamiento y Estabilidad

El kit requiere el envío en frío. Todo el contenido del kit debe almacenarse inmediatamente después de su recepción a -20 ± 5 °C y protegerse de la luz.

La vida útil del kit es de doce meses. El número máximo de ciclos de congelación-descongelación es cinco.

Reactivos y Equipos Adicionales Requeridos pero No Suministrados

- Los instrumentos de PCR compatibles:
Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, ABI StepOnePlus, LightCycler480, cobas® z480, Bio-Rad CFX96, oSLAN-96S.
- Kit de extracción de ADN. Recomendamos utilizar el AmoyDx® FFPE DNA Kit (Cat No.: 8.02.23501X036G) para tejidos FFPE y el AmoyDx® Circulating DNA kit (Cat No.: 8.02.26201X024G) para muestras de plasma / suero.
- Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN.
- Mini centrífuga con rotor para tubos de centrífuga.
- Mini centrífuga con rotor para tubos de PCR.
- Tubos de centrífuga libres de nucleasas.
- Tubos y tapas de PCR libres de nucleasas.
- Pipetas ajustables y puntas de pipeta filtradas para manipular ADN.
- Gradillas para tubos.
- Guantes desechables sin polvo.
- Agua estéril sin nucleasas.
- 1 x TE buffer (pH 8,0).



Precauciones y Requisitos de Manipulación

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Precauciones

- Lea atentamente las instrucciones y familiarícese con todos los componentes del kit antes de usarlo, y siga estrictamente las instrucciones durante el funcionamiento.
- Compruebe los instrumentos de PCR en tiempo real compatibles antes de usarlos.
- NO use el kit ni ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- NO utilice ningún otro reactivo de diferentes lotes en las pruebas.
- NO use ningún otro reactivo de otros kits en las pruebas.

Información de Seguridad

- Manipule todas las muestras y componentes del kit como material potencialmente infeccioso utilizando procedimientos de laboratorio seguros.
- Solo profesionales capacitados pueden utilizar este kit. Utilice una bata de laboratorio adecuada y guantes desechables mientras manipula los reactivos.
- Evite el contacto de la piel, los ojos y las membranas mucosas con los productos químicos. En caso de contacto, enjuague con agua inmediatamente.
- NO pipetee con la boca.

Descontaminación y Desecho

- El kit contiene control positivo; distinga estrictamente el control positivo de otros reactivos para evitar la contaminación que puede causar falsos positivos.

- La amplificación por PCR es extremadamente sensible a la contaminación cruzada. El flujo de tubos, bastidores, pipetas y otros materiales utilizados debe ser desde la preamplificación hasta la posamplificación, y nunca hacia atrás.
- Deben usarse guantes y cambiarse con frecuencia al manipular muestras y reactivos para evitar la contaminación.
- Use pipetas separadas y dedicadas y puntas de pipeta con filtro al manipular muestras y reactivos para evitar la contaminación de ADN exógeno a los reactivos.
- Empaque los tubos posteriores a la amplificación con dos guantes desechables y deséchelos adecuadamente. NO abra los tubos de PCR posteriores a la amplificación.
- Todos los materiales desechables son de un solo uso. NO reutilizar.
- Los reactivos no utilizados, el kit usado y los desechos deben eliminarse adecuadamente.

Limpieza

- Después del experimento, limpie el área de trabajo, rocíe las pipetas y el equipo con etanol al 75% o solución de ácido hipocloroso al 10%.

Configuración del Instrumento

- Configure el volumen de reacción a 40 µL.
- Para Stratagene Mx3000P™, si hay una señal de fluorescencia neta baja (dR) pero una señal de fondo alta (R), reduzca correctamente la configuración de ganancia de señal del instrumento.
- Para instrumentos ABI, configure de la siguiente manera: Reporter Dye: FAM, VIC; Quencher Dye: TAMRA; Passive Reference: NONE.
- Para ABI7900HT, configure de la siguiente manera: Instrumento: Estándar, Velocidad de rampa: Estándar, Volumen de reacción: 40 µL. Es necesario utilizar el adaptador ABI7900, disponible en BIOplastics, Cat No. 7900RAN.
- Para el instrumento LightCycler480 y cobas® z480, utilice el adaptador Roche 480, disponible en BIOplastics, Cat No. B79480.
- Para SLAN-96S, configure de la siguiente manera: Probe mode: FAM, VIC. Durante el análisis de resultados, abra la ventana "Preference", en la sección "Chart Options"; seleccione "Selected Wells" para "Y-Axis Scaling Auto-adjust By" y "Absolute Fluorescence Value Normalization" para "Amplification Curve".
- Consulte el manual de operaciones del instrumento de PCR en tiempo real para obtener instrucciones detalladas.
- Recomendamos que para todos los instrumentos de PCR en uso se realice una calibración de fluorescencia una vez al año.



Procedimiento de Ensayo

1. Extracción de ADN

El material de la muestra debe ser ADN genómico humano extraído de tejido FFPE o muestras de plasma / suero. Los reactivos de extracción de ADN no están incluidos en el kit. Antes de la extracción de ADN, es fundamental utilizar una metodología patológica estándar para garantizar la calidad de la muestra del tumor. Realice la extracción de ADN según las instrucciones del kit de extracción de ADN.

Las muestras de tumores no son homogéneas, también pueden contener tejido no tumoral. Los datos de diferentes secciones de tejido del mismo tumor pueden ser inconsistentes. Es posible que el ADN de tejido no tumoral no contenga mutaciones de *EGFR* detectables. Es mejor utilizar muestras de tejido tumoral con más del 30% de células tumorales.

El valor de OD₂₆₀ / OD₂₈₀ del ADN extraído de tejido FFPE debe estar entre 1.8 ~ 2.0 (medido con el espectrofotómetro, se recomienda el espectrofotómetro NanoDrop 1000/2000).

La cantidad de ADN extraído de tejido FFPE utilizado para la amplificación por PCR se muestra en la Tabla 2. Y el ADN circulante aislado del plasma / suero debe usarse directamente sin dilución.

Tabla 2 Concentración de ADN recomendada

Tejido	Tiempo de almacenamiento	Concentración de ADN	Cantidad de ADN por reacción
FFPE tissue	≤ 3 months	1.5 ng/µL	7.05 ng
	> 3 months & ≤ 1 year	2 ng/µL	9.4 ng
	> 1 year & ≤ 3 years	2.5~3 ng/µL	11.75~14.1 ng

Nota:

- El tejido FFPE debe manipularse y almacenarse correctamente. El tiempo de almacenamiento debe ser preferiblemente inferior a 3 años.
- Las muestras de plasma / suero deben obtenerse de sangre total periférica anticoagulada con EDTA.
- El ADN extraído debe utilizarse inmediatamente. Si no, debe almacenarse a -20 ± 5 °C durante no más de 3 meses.
- Antes de la detección, diluya el ADN de tejido extraído con $1 \times TE$ buffer (pH 8,0) hasta la concentración designada. Recomendamos usar al menos 5 μ L de ADN para diluir 10 veces, para asegurar la validez de la concentración final.

2. Detección de Mutaciones

- 1) Saque las ocho **Reaction Mix**, **EGFR PC**, y **EGFR Enzyme Mix** del kit del congelador.
- 2) Descongele las ocho **Reaction Mix** y **EGFR PC** a temperatura ambiente. Cuando los reactivos se hayan descongelado completamente, invierta cada tubo 10 veces y centrifugue brevemente para recoger todo el líquido en el fondo del tubo.
- 3) Centrifugue brevemente la **EGFR Enzyme Mix** antes de usarla.
- 4) Prepare suficiente EGFR Master Mix 1~8 que contenga EGFR Enzyme Mix y cada Reaction Mix (19-Del / L858R / T790M / Inserciones / G719X / S768I / L861Q / External Control Reaction Mix, respectivamente) en tubos de centrifuga estériles separados de acuerdo con la en la Tabla 3. Mezcle bien cada EGFR Master Mix pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo durante más de 10 veces y centrifugue brevemente.

Tabla 3 EGFR Master Mix

Contenido	Volumen por prueba
Reaction Mix	35 μ L
EGFR Enzyme Mix	0.3 μ L
Total volume	35.3 μL



Nota:

- Cada ejecución de PCR debe contener una PC (control positivo) y un NTC (sin control de plantilla).
 - No agite la mezcla de enzimas ni ninguna mezcla con la mezcla de enzimas.
 - Las mezclas preparadas deben usarse inmediatamente, evite el almacenamiento prolongado.
 - Debido a la viscosidad de la mezcla de enzimas, pipetee lentamente para asegurarse de que toda la mezcla se dispense completamente desde la punta.
 - Pipetee la mezcla de enzimas colocando la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra con un exceso de enzima.
- 5) Extraiga la muestra de ADN (véase la Tabla 2 para ver la concentración de ADN) y el agua sin nucleasas para NTC.
 - 6) Prepare 8 tubos de PCR para NTC: dispense 35,3 μ L de cada mezcla maestra EGFR 1 ~ 8 a cada tubo de PCR respectivamente, luego agregue 4,7 μ L de NTC a cada tubo de PCR y tape los tubos de PCR.
 - 7) Prepare 8 tubos de PCR para cada muestra: dispense 35,3 μ L de cada mezcla maestra EGFR 1 ~ 8 a cada tubo de PCR respectivamente, luego agregue 4,7 μ L de cada muestra de ADN a cada tubo de PCR y tape los tubos de PCR.
 - 8) Prepare 8 tubos de PCR para PC: dispense 35,3 μ L de cada mezcla maestra EGFR 1 ~ 8 a cada tubo de PCR respectivamente, luego agregue 4,7 μ L de PC a cada tubo de PCR de la tira de PC y tape los tubos de PCR.
 - 9) Centrifugue brevemente los tubos de PCR para recoger todo el líquido en el fondo de cada tubo de PCR.
 - 10) Coloque los tubos de PCR en el instrumento de PCR en tiempo real. En la Tabla 4 se muestra un diseño de placa recomendado.

Tabla 4 Diseño de Placa de PCR

Diseño de 96 pocillos												
Assay	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
19-Del	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
L858R	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
T790M	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
Inserctions	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
G719X	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
S768I	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC

L861Q	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
External Control	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC

- 11) Configure el protocolo de PCR utilizando los parámetros de ciclo de la Tabla 5.
- 12) Comience la ejecución de la PCR inmediatamente.
- 13) Cuando finalice la ejecución de la PCR, analice los datos de acuerdo con los procedimientos de "Interpretación de Resultados".

Tabla 5 Parámetros de Ciclos

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Dato Colección
1	1	95°C	5min	/
2	15	95°C	25s	/
		64°C	20s	/
		72°C	20s	/
3	31	93°C	25s	/
		60°C	35s	FAM y HEX/VIC
		72°C	20s	/



3. Interpretación de Resultados

Antes del análisis de los datos de mutación, se deben verificar los siguientes elementos:

- 1) Para NTC: Los valores FAM Ct de los tubos ①~⑦ deben ser ≥ 31 . Si no, los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 2) Para PC: Los valores FAM Ct de los tubos ①~⑧ y los valores HEX / VIC Ct de los tubos ①~⑦ deben ser < 20 . Si no, los datos son INVALIDO. La muestra debe volver a analizarse.
- 3) Para el ensayo de control interno en Tubos ①~⑦ para cada muestra: Los valores HEX / VIC Ct deben ser < 31 . Si no, verifique las señales de FAM mutante en los Tubos ①~⑦:
 - a) Si el valor de Ct de FAM mutante es < 31 , continuar con el análisis.
 - b) Si el valor de Ct de FAM mutante es ≥ 31 , el dato es INVALIDO. La muestra debe volver a analizarse.
- 4) Para el ensayo de control externo en el tubo ⑧ para cada muestra:
 - a) El valor de FAM Ct debe estar entre 13~21 para el ADN extraído de tejidos FFPE y entre 13 ~ 19 para el ADN extraído de plasma / suero.
 - b) Si el valor de FAM Ct es < 13 , esto indica que el ADN está sobrecargado. La cantidad de ADN debe reducirse y volverse a analizar. Pero si los valores de FAM Ct de los tubos ①~ están en el rango de Ct negativo (véase la Tabla 6), la muestra se determina como negativa.
 - c) Si el valor FAM Ct es > 21 para ADN extraído de tejidos FFPE o > 19 para ADN extraído de plasma / suero, esto indica la degradación del ADN o la presencia de inhibidores de la PCR, o cualquier error en la operación experimental. La muestra debe volver a analizarse con ADN aumentado o extraído nuevamente. Pero si cualquier valor de FAM Ct de los tubos ①~⑦ es < 26 , la muestra se determina como positiva.

Analice el ensayo de mutación para cada muestra:

- 5) Registre los valores de FAM Ct en Tubos ①~⑦ para cada muestra.
- 6) Verifique los valores de Ct de FAM mutante en los tubos ①~⑦ de acuerdo con la Tabla 6:
 - a) Si cualquier valor de FAM Ct del tubo ①~⑦ es < 26 , la muestra se determina como positiva (se detectó una mutación de EGFR).
 - b) Si cualquier valor de FAM Ct de los tubos ①~⑦ está en el rango de Ct aceptable, calcule el valor de ΔCt para cada mutación que muestre amplificación positiva.
 - i. **Valor de $\Delta Ct = \text{Valor Ct de FAM Mutante} - \text{Valor Ct de FAM Control Externo}$.**
 - ii. Si el valor de ΔCt es $<$ el valor de ΔCt de corte, la muestra se determina como positiva (Mutación detectada).
 - iii. Si el valor de ΔCt es \geq el valor de ΔCt de corte, la muestra se determina como negativa (Mutación no detectada) o debajo del

LOD del kit.

- c) Si todos los valores de FAM Ct de los tubos ①~⑦ están en el rango de Ct negativo o no hay amplificación, la muestra se determina como negativa o debajo del LOD del kit.

Tabla 6 Determinación de Resultados

Mutación	19-Del	L858R	T790M	Insertions	G719X	S768I	L861Q	Resultados
Óptimo Rango de Ct	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Positivo
Rango de Ct aceptable	26≤Ct<29	26≤Ct<29	26≤Ct<28	26≤Ct<29	26≤Ct<29	26≤Ct<29	26≤Ct<29	Interprete los resultados de acuerdo con el valor de ΔCt.
Valor de ΔCt de corte	12	11	7	9	7	8	8	
Rango de Ct negativo	Ct≥29	Ct≥29	Ct≥28	Ct≥29	Ct≥29	Ct≥29	Ct≥29	Negativo o bajo el LOD*.

* LOD: límite de detección

Características de Presentación

Las características de rendimiento de este kit se validaron en Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, ABI StepOnePlus, LightCycler480, cobas® z480, Bio-Rad CFX96 y SLAN-96S.

1. Sensibilidad analítica:

La sensibilidad analítica del kit se estableció utilizando ADN plasmídico. Se diluyeron 29 ADN de plásmido mutante EGFR simple con 2 ng/μL de ADN de tipo salvaje para preparar 29 ADN de plásmido con un contenido de mutante del 1%. Los 29 ADN de plásmido mutante EGFR único con un contenido de mutante del 1% se analizaron para 20 repeticiones utilizando tres lotes del Kit de Detección de Mutaciones AmoyDx® EGFR 29 y arrojaron una tasa positiva de al menos el 95%. Por lo tanto, el kit permite la detección de ADN mutante al 1% en un fondo de ADN normal al 99% a una cantidad de muestra de ADN de 10 ng.

2. Especificidad:

La especificidad del kit se estableció probando 10 controles de referencia negativos, que se prepararon a partir de 30 casos de muestras de tejido NSCLC FFPE con ADN de tipo salvaje confirmado por secuenciación de Sanger. La prueba dio resultados negativos y con una tasa de concordancia del 100%.

3. Exactitud:

La exactitud del kit se estableció mediante la prueba de 29 controles de referencia positivos de EGFR, que se prepararon a partir de 29 casos de muestras de tejido de NSCLC FFPE con mutaciones de EGFR confirmadas por secuenciación de Sanger. La prueba dio los correspondientes resultados positivos y con una tasa de concordancia del 100%.

4. Precisión:

En la validación se utilizaron 3 controles de precisión: control negativo, control positivo débil (el contenido de mutante es 5%) y control positivo fuerte (el contenido de mutante es 50%). Se probaron 3 lotes de los kits con los controles de precisión por 2 operadores dos veces al día durante 20 días en diferentes instrumentos de PCR. Se calcularon los valores de Ct, los valores de CV estaban todos dentro del 5%.

5. Sustancia interferente:

En este estudio se evaluaron dos sustancias de interferencia comunes, la hemoglobina y los triglicéridos. Se confirma que las concentraciones máximas potenciales: 15 mg / mL de hemoglobina y 37 mmol / L de triglicéridos no interferirían con el resultado de la prueba.

Limitaciones

- 1) El kit debe ser utilizado únicamente por personal especialmente capacitado en técnicas de PCR.
- 2) Los resultados se pueden utilizar para ayudar al diagnóstico clínico, combinados con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
- 3) El kit ha sido validado para su uso con ADN extraído de muestras de tejido y plasma / suero FFPE.
- 4) El kit solo puede detectar las 29 mutaciones de EGFR enumeradas en el apéndice.
- 5) Los resultados confiables dependen del procesamiento, transporte y almacenamiento adecuados de las muestras.
- 6) La muestra que contiene ADN degradado puede afectar la capacidad de la prueba para detectar la mutación EGFR.
- 7) Las muestras con resultado negativo (sin mutación detectada) pueden albergar mutaciones de EGFR no detectadas por este ensayo.

- 8) El ADN circulante extraído del plasma o suero con resultados negativos (sin mutación detectada) puede albergar una mutación de EGFR, que podría confirmarse con la detección de ADN de tejido coincidente.

Referencias

- Shama SV, Bell DW, Settleman J, et al; Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007,7(3):169-81.
- Ressel R, Moran T, Queralt C, et al; Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*, 2009,361(10):958-67.
- Mork Ts, Wu YL, Thongprasert S, et al; Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2009,361(10):947-57.
- Gazdar AF; Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N Engl J Med*, 2009, 361(10):1018-20.
- Dancey JE; Epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer. *Drugs*, 2007, 67(8):1125-38.
- Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al; *EGFR* mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2005, 352(8):786-92.
- Yasuda H., S kobayshi, Costa, D. B, et al. *EGFR* exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol.* 2012, 13(1): e23-31.
- Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, et al; Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer*, 2007, 97(6): 778-784.
- Huang Z, Wang ZJ, Bai H, et al; The detection of EGFR mutation status in plasma is reproducible and can dynamically predict the efficacy of EGFR-TKI. *Thoracic Cancer*, 2012, 3(4): 334-340.

Simbolos



Representante Autorizado en la Comunidad Europea



Fabricante



Número de Lote



Contiene Suficientes Reactivos para <n> Pruebas



Consultar Las Instrucciones de Uso



La Dirección Arriba



Dispositivo Médico de Diagnóstico in Vitro



Número de Catalogo



Fecha de Caducidad



Limitación de Temperatura



Mantener Seco



Frágil, Manipular con Cuidado



Apéndice

Mutaciones de EGFR detectadas por el Kit

No. de Tubo	Reactivo	Exón	Mutación	Cambio de Base	Cosmic ID
①	19-Del Reaction Mix	19	E746_A750del (1)	2235_2249del15	6223
			E746_A750del (2)	2236_2250del15	6225
			L747_P753>S	2240_2257del18	12370
			E746_T751>I	2235_2252>AAT(complex)	13551
			E746_T751del	2236_2253del18	12728
			E746_T751>A	2237_2251del15	12678
			E746_S752>A	2237_2254del18	12367
			E746_S752>V	2237_2255>T(complex)	12384
			E746_S752>D	2238_2255del18	6220
			L747_A750>P	2238_2248>GC(complex)	12422
			L747_T751>Q	2238_2252>GCA(complex)	12419
			L747_E749del	2239_2247del19	6218
			L747_T751del	2239_2253del15	6254
			L747_S752del	2239_2256del18	6255
			L747_A750>P	2239_2248TTAAGAGAAG>C(complex)	12382
			L747_P753>Q	2239_2258>CA(complex)	12387
			L747_T751>S	2240_2251del12	6210

			L747_T751del	2240_2254del15	12369
			L747_T751>P	2239_2251>C(complex)	12383
②	L858R Reaction Mix	21	L858R	2573T>G	6224
③	T790M Reaction Mix	20	T790M	2369C>T	6240
④	Insertions Reaction Mix	20	H773_V774insH	2319_2320insCAC	12377
			D770_N771insG	2310_2311insGGT	12378
			V769_D770insASV	2307_2308insGCCAGCGTG	12376
⑤	G719X Reaction Mix	18	G719A	2156G>C	6239
			G719S	2155G>A	6252
			G719C	2155G>T	6253
⑥	S768I Reaction Mix	20	S768I	2303G>T	6241
⑦	L861Q Reaction Mix	21	L861Q	2582T>A	6213


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



AmoyDx[®] EGFR 29 Mutations Detection Kit

Detección de 29 mutaciones en los exones 18-21

Instrucción de Uso

REF	8.01.20201W010A	10 pruebas	Para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT
REF	8.01.20201W010B	10 pruebas	Para LightCycler480, cobas [®] z480, Bio-Rad CFX96
REF	8.01.20201W010D	10 pruebas	Para SLAN-96S



Amoy Diagnostics Co., Ltd.
39 Dingshan Road, Haicang District,
Xiamen 361027, P. R. China
Tel: +86 592 6806835
Fax: +86 592 6806839
Correo electrónico: sales@amoydx.com
Sitio web: <http://www.amoydx.com>



Qarad EC-REP BV
Pas 257,
2440 Geel, Bélgica

Versión: P4.5
Abril 2021

Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) juega un papel central en la transmisión de señales que promueven el crecimiento y la proliferación celular. Debido a su asociación con neoplasias malignas, el EGFR se ha convertido en el objetivo de una clase en expansión de terapias contra el cáncer, como gefitinib, erlotinib y afatinib, que son inhibidores de la tirosina quinasa (TKI). Los TKI se dirigen al dominio de tirosina quinasa EGFR. Estos medicamentos funcionan mejor en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) cuyo cáncer se debe a una señalización anormal del EGFR. Se ha descubierto que los pacientes con cáncer de pulmón que experimentaron respuestas rápidas, duraderas, completas o parciales a la terapia con TKI albergan mutaciones somáticas en el gen EGFR. Los pacientes con CPCNP con mutaciones sensibilizantes del EGFR tratados con terapia con TKI han mostrado una supervivencia sin progresión más prolongada y una tasa de respuesta más alta, en comparación con la quimioterapia convencional. La resistencia a la terapia con TKI, ya sea en el tumor primario o adquirida después del tratamiento con TKI, se asocia con la mutación EGFR T790M. Por lo tanto, la evaluación del estado de la mutación EGFR facilita el tratamiento personalizado de los pacientes con cáncer de pulmón.

Uso Previsto

El AmoyDx® *EGFR* 29 Mutations Detection Kit es un ensayo de PCR en tiempo real para la detección cualitativa de 29 mutaciones somáticas en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR en ADN genómico humano extraído de un tumor incrustado en parafina fijado con formalina (FFPE) tejido, o ADN circulante extraído de plasma / suero. El kit está diseñado para evaluar el estado de la mutación de EGFR en pacientes con NSCLC y ayudar a identificar a los pacientes que pueden responder al tratamiento con un EGFR-TKI.

El kit es para uso diagnóstico in vitro y está destinado a ser utilizado por profesionales capacitados en un entorno de laboratorio.



Principios del Procedimiento

El kit adopta la tecnología Amplification Refractory Mutation System (ARMS) que comprende cebadores específicos y sondas fluorescentes para detectar mutaciones genéticas en un ensayo de PCR en tiempo real. Durante la amplificación del ácido nucleico, el ADN mutante objetivo se empareja con las bases en el extremo 3' del cebador, se amplifica de manera selectiva y eficiente, luego el amplicón mutante se detecta mediante sondas fluorescentes marcadas con FAM. Si bien el ADN de tipo salvaje no se puede emparejar con cebadores específicos, no se produce amplificación.

El kit está compuesto por tiras *EGFR* Reaction Mix, *EGFR* Enzyme Mix y *EGFR* Positive Control.

- 1) La ***EGFR* Reaction Mix** en tubos ①~⑦ incluye un sistema de detección de mutaciones y sistemas de control interno. El sistema de detección de mutaciones incluye cebadores y sondas marcadas con FAM específicos para mutaciones EGFR designadas, que se utilizan para detectar el estado de la mutación EGFR. El sistema de control interno contiene cebadores y una sonda marcada con HEX para una región de ADN genómico sin mutaciones conocidas ni polimorfismo, para detectar la presencia de inhibidores y monitorear la precisión de la operación experimental.
- 2) La **External Control Reaction Mix** en el tubo ⑧ de cada tira de ***EGFR* Reaction Mix** contiene cebadores y una sonda marcada con FAM para una región de ADN genómico sin mutaciones ni polimorfismos conocidos, que se utiliza para evaluar la calidad del ADN.
- 3) El ***EGFR* Positive Control** (PC) contiene un gen recombinante con mutaciones de EGFR.
- 4) La ***EGFR* Enzyme Mix** contiene ADN polimerasa Taq para amplificación por PCR y uracil-N-glicosilasa que funciona a temperatura ambiente para evitar la contaminación por arrastre de amplicones de PCR.

Contenido del Kit

El kit contiene los siguientes materiales:

Tabla 1 Contenido del Kit

Contenido	Ingredientes Principales	Cantidad
<i>EGFR</i> Reaction Mix	8-tube Strip*	12 strips
<i>EGFR</i> Enzyme Mix	Taq DNA Polymerase, Uracil-N-Glycosylase	45 µL/tube ×1

EGFR Positive Control Plasmid DNA 250 µL/tube ×1

* Cada tira (8-tubo) incluye el siguiente contenido para analizar una muestra o un control (Tabla 2)

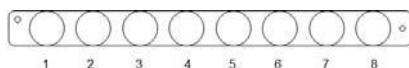
Tabla 2 Información de la tira de 8 tubos

No. de Tubo	Reactivo	Ingredientes Principales	Cantidad	Señal fluorescente
①	19-Del Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
②	L858R Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
③	T790M Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
④	Insertions Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑤	G719X Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑥	S768I Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑦	L861Q Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑧	External Control Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM

Nota:

REF 8.012.0201W010A / 8.01.20201W010B / 8.01.20201W010D:

Distinga el tubo ⑧ del tubo ① según la posición del orificio en el borde de la tira, que se describe a continuación.



Storage and Stability

El kit requiere el envío en frío. Todo el contenido del kit debe almacenarse inmediatamente después de su recepción a -20 ± 5 °C y protegerse de la luz.

La vida útil del kit es de doce meses. El número máximo de ciclos de congelación-descongelación es cinco.

Reactivos y Equipos Adicionales Requeridos pero No Suministrados

- Los instrumentos de PCR compatibles::
Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, LightCycler480, cobas® z480, Bio-Rad CFX96, o SLAN-96S.
- Kit de extracción de ADN. Recomendamos utilizar el AmoyDx® FFPE DNA Kit (Cat No.: 8.02.23501X036G) para tejidos FFPE y el AmoyDx® Circulating DNA kit (Cat No.: 8.02.26201X024G) para muestras de plasma / suero.
- Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN.
- Mini centrífuga con rotor para tubos de centrífuga.
- Mini centrífuga con rotor para tubos de PCR.
- Tubos de centrífuga libres de nucleasas.
- Tubos y tapas de PCR libres de nucleasas.
- Pipetas ajustables y puntas de pipeta filtradas para manipular ADN.
- Gradillas para tubos.
- Guantes desechables sin polvo.
- Agua estéril sin nucleasas.
- 1 x TE buffer (pH 8,0).

Precauciones y Requisitos de Manipulación

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Precauciones

- Lea atentamente las instrucciones y familiarícese con todos los componentes del kit antes de usarlo, y siga estrictamente las instrucciones durante el funcionamiento.

- Compruebe los instrumentos de PCR en tiempo real compatibles antes de usarlos.
- NO use el kit ni ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- NO utilice ningún otro reactivo de diferentes lotes en las pruebas.
- NO use ningún otro reactivo de otros kits en las pruebas.



Información de Seguridad

- Manipule todas las muestras y componentes del kit como material potencialmente infeccioso utilizando procedimientos de laboratorio seguros.
- Solo profesionales capacitados pueden utilizar este kit. Utilice una bata de laboratorio adecuada y guantes desechables mientras manipula los reactivos.
- Evite el contacto de la piel, los ojos y las membranas mucosas con los productos químicos. En caso de contacto, enjuague con agua inmediatamente.
- NO pipetee con la boca.

Descontaminación y Desecho

- El kit contiene control positivo; distinga estrictamente el control positivo de otros reactivos para evitar la contaminación que puede causar falsos positivos.
- La amplificación por PCR es extremadamente sensible a la contaminación cruzada. El flujo de tubos, bastidores, pipetas y otros materiales utilizados debe ser desde la preamplificación hasta la posamplificación, y nunca hacia atrás.
- Deben usarse guantes y cambiarse con frecuencia al manipular muestras y reactivos para evitar la contaminación.
- Use pipetas separadas y dedicadas y puntas de pipeta con filtro al manipular muestras y reactivos para evitar la contaminación de ADN exógeno a los reactivos.
- Empaque los tubos posteriores a la amplificación con dos guantes desechables y deséchelos adecuadamente. NO abra los tubos de PCR posteriores a la amplificación.
- Todos los materiales desechables son de un solo uso. NO reutilizar.
- Los reactivos no utilizados, el kit usado y los desechos deben eliminarse adecuadamente.

Limpieza

- Después del experimento, limpie el área de trabajo, rocíe las pipetas y el equipo con etanol al 75% o solución de ácido hipocloroso al 10%.

Configuración del Instrumento

- Configure el volumen de reacción a 40 µL.
- Para Stratagene Mx3000P™, si hay una señal de fluorescencia neta baja (dR) pero una señal de fondo alta (R), reduzca correctamente la configuración de ganancia de señal del instrumento.
- Para instrumentos ABI, configure de la siguiente manera: Reporter Dye: FAM, VIC; Quencher Dye: TAMRA; Passive Reference: NONE.
- Para ABI7900HT, configure de la siguiente manera: Instrumento: Estándar, Velocidad de rampa: Estándar, Volumen de reacción: 40 µL. Es necesario utilizar el adaptador ABI7900, disponible en BIOplastics, Cat No. 7900RAN.
- Para el instrumento LightCycler480 y cobas® z480, utilice el adaptador Roche 480, disponible en BIOplastics, Cat No. B79480.
- Para SLAN-96S, configure de la siguiente manera: Probe mode: FAM, VIC. Durante el análisis de resultados, abra la ventana "Preference", en la sección "Chart Options"; seleccione "Selected Wells" para "Y-Axis Scaling Auto-adjust By" y "Absolute Fluorescence Value Normalization" para "Amplification Curve".
- Consulte el manual de operaciones del instrumento de PCR en tiempo real para obtener instrucciones detalladas.
- Recomendamos que para todos los instrumentos de PCR en uso se realice una calibración de fluorescencia una vez al año.

Procedimiento de Ensayo

1. DNA Extraction

El material de la muestra debe ser ADN genómico humano extraído de tejido FFPE o muestras de plasma / suero. Los reactivos de extracción de ADN no están incluidos en el kit. Antes de la extracción de ADN, es fundamental utilizar una metodología patológica estándar para garantizar la calidad de la muestra del tumor. Realice la extracción de ADN según las instrucciones del kit de extracción de ADN.

Las muestras de tumores no son homogéneas, también pueden contener tejido no tumoral. Los datos de diferentes secciones de tejido del mismo tumor pueden ser inconsistentes. Es posible que el ADN de tejido no tumoral no contenga mutaciones de EGFR detectables. Es mejor utilizar muestras de tejido tumoral con más del 30% de células tumorales.

El valor de OD₂₆₀ / OD₂₈₀ del ADN extraído de tejido FFPE debe estar entre 1.8 ~ 2.0 (medido con el espectrofotómetro, se recomienda el espectrofotómetro NanoDrop 1000/2000).

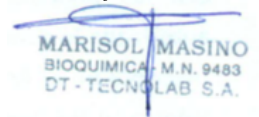
La cantidad de ADN extraído de tejido FFPE utilizado para la amplificación por PCR se muestra en la Tabla 3. Y el ADN circulante aislado del plasma / suero debe usarse directamente sin dilución.

Tabla 3 Concentración de ADN recomendada

Tejido	Tiempo de almacenamiento	Concentración de ADN	Cantidad de ADN por reacción
Tejido FFPE	≤ 3 months	1.5 ng/μL	7.05 ng
	> 3 months & ≤ 1 year	2 ng/μL	9.4 ng
	> 1 year & ≤ 3 years	2.5~3 ng/μL	11.75~14.1 ng

Note:

- El tejido FFPE debe manipularse y almacenarse correctamente. El tiempo de almacenamiento debe ser preferiblemente inferior a 3 años.
- Las muestras de plasma / suero deben obtenerse de sangre total periférica anticoagulada con EDTA.
- El ADN extraído debe utilizarse inmediatamente. Si no, debe almacenarse a -20 ± 5 °C durante no más de 3 meses.
- Antes de la detección, diluya el ADN de tejido extraído con 1 ×TE buffer (pH 8,0) hasta la concentración designada. Recomendamos usar al menos 5 μL de ADN para diluir 10 veces, para asegurar la validez de la concentración final.



2. Detección de Mutaciones

- 1) Saque el **EGFR PC** y **EGFR Enzyme Mix** del kit del congelador y los demás reactivos quedaron en el congelador a -20 ± 5 °C.
- 2) Descongele el **EGFR PC** a temperatura ambiente. Cuando el reactivo esté completamente descongelado, invierta el tubo 10 veces y centrifugue brevemente para recolectar todo el líquido en el fondo del tubo.
- 3) Centrifugue brevemente la **EGFR Enzyme Mix** antes de usarla.
- 4) Saque la muestra de ADN (véase la Tabla 3 para conocer la concentración de ADN) y el agua libre de nucleasas para NTC (*sin control de plantilla*).
- 5) Prepare la mezcla de NTC: pipetee 42,3 μL de agua libre de nucleasas (NTC) y 2,7 μL de **EGFR Enzyme Mix** en un tubo de centrifuga. Mezcle bien la mezcla anterior pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo más de 10 veces.
- 6) Prepare la mezcla de muestra de ADN: pipetee 42,3 μL de cada muestra de ADN y 2,7 μL de **EGFR Enzyme Mix** en un tubo de centrifuga. Mezcle bien cada mezcla anterior pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo más de 10 veces.
- 7) Prepare la mezcla de control positivo (PC): pipetee 42,3 μL de **EGFR Positive control** y 2,7 μL de **EGFR Enzyme Mix** en un tubo de centrifuga. Mezcle bien la mezcla anterior pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo más de 10 veces.

Nota:

- Cada ejecución de PCR debe contener un control positivo (PC) y un control sin plantilla (NTC).
 - Las mezclas preparadas deben usarse inmediatamente, evite el almacenamiento prolongado.
 - Debido a la viscosidad de la mezcla de enzimas, pipetee lentamente para asegurarse de que toda la mezcla se dispense por completo desde la punta.
 - Pipetee la mezcla de enzima colocando la punta de la pipeta justo debajo de la superficie del líquido para evitar que la punta se cubra con un exceso de enzima.
 - No agite la mezcla de enzimas ni ninguna mezcla con la mezcla de enzimas.
- 8) Centrifugue brevemente.

- 9) Saque las tiras de 8 tubos (**EGFR Reaction Mix**) según sea necesario (suficiente para muestras, PC y NTC) y centrifugue las tiras si hay alguna gota en las tapas de los tubos de PCR. Luego destape suavemente las tapas antes de usar.
- 10) Añada 5 µL de la mezcla NTC preparada a cada tubo de PCR de la tira de NTC y tape los tubos de PCR.
- 11) Añada 5 µL de cada mezcla de ADN de muestra preparada a cada tubo de PCR de la tira de muestra y tape los tubos de PCR.
- 12) Añada 5 µL de la mezcla de PC preparada a cada tubo de PCR de la tira de PC y tape los tubos de PCR.
- 13) Centrifugue brevemente los tubos de PCR para recoger todo el líquido en el fondo de cada tubo de PCR.
- 14) Coloque los tubos de PCR en el instrumento de PCR en tiempo real. En la Tabla 4 se muestra un diseño de placa recomendado.

Tabla 4 Diseño de Placa de PCR

Diseño de 96 pozos												
Assay	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
19-Del	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
L858R	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
T790M	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
Insertions	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
G719X	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
S768I	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
L861Q	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC
External Control	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra4	Muestra5	Muestra6	Muestra7	Muestra8	Muestra9	Muestra10	PC	NTC

- 15) Configure el protocolo de PCR utilizando los parámetros de ciclo de la Tabla 5.

Tabla 5 Parámetros de Ciclos

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Dato Colección
1	1	95°C	5min	/
		95°C	25s	/
2	15	64°C	20s	/
		72°C	20s	/
		93°C	25s	/
3	31	60°C	35s	FAM y HEX/VIC
		72°C	20s	/



- 16) Comience la ejecución de la PCR inmediatamente.
- 17) Cuando finalice la ejecución de la PCR, analice los datos de acuerdo con los procedimientos de "Interpretación de Resultados".

3. Interpretación de Resultados

Antes del análisis de los datos de mutación, se deben verificar los siguientes elementos:

- 1) Para NTC: Los valores FAM Ct de los tubos ①~⑦ deben ser ≥ 31 . Si no, los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 2) Para PC: Los valores FAM Ct de los tubos ①~⑧ y los valores HEX / VIC Ct de los tubos ①~⑦ deben ser < 20 . Si no, los datos son INVALIDO. La muestra debe volver a analizarse.
- 3) Para el ensayo de control interno en Tubos ①~⑦ para cada muestra: Los valores HEX / VIC Ct deben ser < 31 . Si no, verifique las señales de FAM mutante en los Tubos ①~⑦:
 - a) Si el valor de Ct de FAM mutante es < 31 , continuar con el análisis.
 - b) Si el valor de Ct de FAM mutante es ≥ 31 , los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 4) Para el ensayo de control externo en el tubo ⑧ para cada muestra:
 - a) El valor de FAM Ct debe estar entre 13~21 para el ADN extraído de tejidos FFPE y entre 13~19 para el ADN extraído de plasma / suero.

- b) Si el valor de FAM Ct es < 13, esto indica que el ADN está sobrecargado. La cantidad de ADN debe reducirse y volverse a analizar. Pero si los valores de FAM Ct de los tubos ①~⑦ están en el rango de Ct negativo (véase la Tabla 6), la muestra se determina como negativa.
- c) Si el valor FAM Ct es > 21 para el ADN extraído de tejidos FFPE o > 19 para el ADN extraído de plasma / suero, esto indica la degradación del ADN o la presencia de inhibidores de la PCR, o cualquier error en la operación experimental. La muestra debe volver a analizarse con ADN aumentado o extraído nuevamente. Pero si cualquier valor de FAM Ct de los tubos ①~⑦ es < 26, la muestra se determina como positiva.

Analice el ensayo de mutación para cada muestra:

- 5) Registre los valores de FAM Ct en Tubos ①~⑦ para cada muestra.
- 6) Verifique los valores de Ct de FAM mutante en los tubos ①~⑦ de acuerdo con la Tabla 6:
- Si cualquier valor de FAM Ct del tubo ①~⑦ es < 26, la muestra se determina como positiva (se detectó una mutación de EGFR).
 - Si cualquier valor de FAM Ct de los tubos ①~⑦ está en el rango de Ct aceptable, calcule el valor de ΔCt para cada mutación que muestre amplificación positiva.
 - Valor de $\Delta Ct = \text{Valor Ct de FAM Mutante} - \text{Valor Ct de FAM Control Externo}$.**
 - Si el valor de ΔCt es < el valor de ΔCt de corte, la muestra se determina como positiva (Mutación detectada).
 - Si el valor de ΔCt es \geq el valor de ΔCt de corte, la muestra se determina como negativa (Mutación no detectada) o debajo del LOD del kit.
 - Si todos los valores de FAM Ct de los tubos ①~⑦ están en el rango de Ct negativo o no hay amplificación, la muestra se determina como negativa o debajo del LOD del kit.



Tabla 6 Determinación de Resultados

Mutación	19-Del	L858R	T790M	Insertions	G719X	S768I	L861Q	Resultados
Óptimo Rango de Ct	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Positivo
Rango de Ct aceptable	26≤Ct<29	26≤Ct<29	26≤Ct<28	26≤Ct<29	26≤Ct<29	26≤Ct<29	26≤Ct<29	Interprete los resultados de acuerdo con el valor de ΔCt .
Valor de ΔCt de corte	12	11	7	9	7	8	8	
Rango de Ct negativo	Ct≥29	Ct≥29	Ct≥28	Ct≥29	Ct≥29	Ct≥29	Ct≥29	Negativo o bajo el LOD*.

* LOD: límite de detección

Características de Presentación

Las características de rendimiento de este kit se validaron en Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, LightCycler480, cobas® z480, Bio-Rad CFX96, y SLAN-96S.

1. Sensibilidad analítica:

La sensibilidad analítica del kit se estableció utilizando ADN plasmídico. Se diluyeron 29 ADN de plásmido mutante EGFR simple con 2 ng/μL de ADN de tipo salvaje para preparar 29 ADN de plásmido con un contenido de mutante del 1%. Los 29 ADN de plásmido mutante EGFR único con un contenido de mutante del 1% se analizaron para 20 repeticiones utilizando tres lotes del Kit de Detección de Mutaciones AmoyDx® EGFR 29 y arrojaron una tasa positiva de al menos el 95%. Por lo tanto, el kit permite la detección de ADN mutante al 1% en un fondo de ADN normal al 99% a una cantidad de muestra de ADN de 10 ng.

2. Especificidad:

La especificidad del kit se estableció probando 10 controles de referencia negativos, que se prepararon a partir de 30 casos de muestras de tejido NSCLC FFPE con ADN de tipo salvaje confirmado por secuenciación de Sanger. La prueba dio resultados negativos y con una tasa de concordancia del 100%.

3. Exactitud:

La exactitud del kit se estableció mediante la prueba de 29 controles de referencia positivos de EGFR, que se prepararon a partir de 29 casos de muestras de tejido de NSCLC FFPE con mutaciones de EGFR confirmadas por secuenciación de Sanger. La prueba dio los

correspondientes resultados positivos y con una tasa de concordancia del 100%.

4. Precisión:

En la validación se utilizaron 3 controles de precisión: control negativo, control positivo débil (el contenido de mutante es 5%) y control positivo fuerte (el contenido de mutante es 50%). Se probaron 3 lotes de los kits con los controles de precisión por 2 operadores dos veces al día durante 20 días en diferentes instrumentos de PCR. Se calcularon los valores de Ct, los valores de CV estaban todos dentro del 5%.

5. Sustancia interferente:

En este estudio se evaluaron dos sustancias de interferencia comunes, la hemoglobina y los triglicéridos. Se confirma que las concentraciones máximas potenciales: 15 mg / mL de hemoglobina y 37 mmol / L de triglicéridos no interferirían con el resultado de la prueba.



Limitaciones

- 1) El kit debe ser utilizado únicamente por personal especialmente capacitado en técnicas de PCR.
- 2) Los resultados se pueden utilizar para ayudar al diagnóstico clínico, combinados con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
- 3) El kit ha sido validado para su uso con ADN extraído de muestras de tejido y plasma / suero FFPE.
- 4) El kit solo puede detectar las 29 mutaciones de EGFR enumeradas en el apéndice.
- 5) Los resultados confiables dependen del procesamiento, transporte y almacenamiento adecuados de las muestras.
- 6) La muestra que contiene ADN degradado puede afectar la capacidad de la prueba para detectar la mutación EGFR.
- 7) Las muestras con resultado negativo (sin mutación detectada) pueden albergar mutaciones de EGFR no detectadas por este ensayo.
- 8) El ADN circulante extraído del plasma o suero con resultados negativos (sin mutación detectada) puede albergar una mutación de EGFR, que podría confirmarse con la detección de ADN de tejido coincidente.

Referencias

- 1) Shama SV, Bell DW, Settleman J, et al; Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer, 2007,7(3):169-81.
- 2) Ressel R, Moran T, Queralt C, et al; Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. N Engl J Med, 2009,361(10):958-67.
- 3) Mork Ts, Wu YL, Thongprasert S, et al; Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med, 2009,361(10):947-57.
- 4) Gazdar AF; Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. N Engl J Med, 2009, 361(10):1018-20.
- 5) Dancy JE; Epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer. Drugs, 2007, 67(8):1125-38.
- 6) Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al; EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med, 2005, 352(8):786-92.
- 7) Yasuda H., S Kobayshi, Costa, D. B., et al. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. Lancet Oncol, 2012, 13(1): e23-31.
- 8) Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, et al; Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). Br J Cancer, 2007, 97(6): 778-784.
- 9) Huang Z, Wang ZJ, Bai H, et al; The detection of EGFR mutation status in plasma is reproducible and can dynamically predict the efficacy of EGFR-TKI. Thoracic Cancer, 2012, 3(4): 334-340.



Simbolos



Representante Autorizado en la Comunidad Europea



Dispositivo Médico de Diagnóstico in Vitro



Fabricante



Número de Catalogo



Número de Lote



Fecha de Caducidad



Contiene Suficientes Reactivos para <n> Pruebas



Limitación de Temperatura



Consultar Las Instrucciones de Uso



Mantener Seco



La Dirección Arriba



Frágil, Manipular con Cuidado

Apéndice

Mutaciones de EGFR detectadas por el Kit

Tube No.	Reagent	Exon	Mutation	Base Change	Cosmic ID
①	19-Del Reaction Mix	19	E746_A750del (1)	2235_2249del15	6223
			E746_A750del (2)	2236_2250del15	6225
			L747_P753>S	2240_2257del18	12370
			E746_T751>I	2235_2252>AAT(complex)	13551
			E746_T751del	2236_2253del18	12728
			E746_T751>A	2237_2251del15	12678
			E746_S752>A	2237_2254del18	12367
			E746_S752>V	2237_2255>T(complex)	12384
			E746_S752>D	2238_2255del18	6220
			L747_A750>P	2238_2248>GC(complex)	12422
			L747_T751>Q	2238_2252>GCA(complex)	12419
			L747_E749del	2239_2247del9	6218
			L747_T751del	2239_2253del15	6254
			L747_S752del	2239_2256del18	6255
			L747_A750>P	2239_2248TTAAGAGAAG>C(complex)	12382
			L747_P753>Q	2239_2258>CA(complex)	12387
			L747_T751>S	2240_2251del12	6210
L747_T751del	2240_2254del15	12369			
L747_T751>P	2239_2251>C(complex)	12383			
②	L858R Reaction Mix	21	L858R	2573T>G	6224
③	T790M Reaction Mix	20	T790M	2369C>T	6240
④	Insertions Reaction Mix	20	H773_V774insH	2319_2320insCAC	12377
			D770_N771insG	2310_2311insGGT	12378
			V769_D770insASV	2307_2308insGCCAGCGTG	12376
⑤	G719X Reaction Mix	18	G719A	2156G>C	6239
			G719S	2155G>A	6252
			G719C	2155G>T	6253
⑥	S768I Reaction Mix	20	S768I	2303G>T	6241
⑦	L861Q Reaction Mix	21	L861Q	2582T>A	6213



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: Rótulos e ifus EX-2021-56396600- -APN-DGA#ANMAT

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 36 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.05.09 11:42:31 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.05.09 11:42:32 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: EX-2021-56396600-APN-DGA#ANMAT

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

Nº EX-2021-56396600-APN-DGA#ANMAT

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que, de acuerdo con lo solicitado por la firma TECNOLAB S.A., se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), del nuevo producto médico para diagnóstico in vitro con los siguientes datos identificatorios característicos:

NOMBRE COMERCIAL: AmoyDx® EGFR 29 Mutations Detection Kit 8.01.20201X024F; 24 pruebas (para Rotor-Gene Q/6000) 8.01.20201X024E; 24 pruebas (para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, ABI StepOnePlus, LightCycler 480, Bio-Rad CFX96, SLAN-96S). 8.01.20201W010A; 10 pruebas (para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT). 8.01.20201W010B; 10 pruebas (para LightCycler480, Bio-Rad CFX96). 8.01.20201W010D; 10 pruebas (para SLAN-96S).

INDICACION DE USO: ensayo de PCR a Tiempo Real para la detección cualitativa de 29 mutaciones somáticas en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR en ADN genómico humano extraído de muestras de tejido tumoral fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE), o ADN circulante extraído de plasma/suero. El kit está diseñado para evaluar el estado de la mutación de EGFR en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y ayudar a identificar a los pacientes que pueden responder al tratamiento con un EGFR-TKI: inhibidor de la tirosina quinasa (TKI) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

FORMA DE PRESENTACIÓN: 8.01.20201X024F; 24 pruebas (para Rotor-Gene Q/6000) El kit está compuesto por nueve viales con mezcla de reacción (Reaction Mix), un vial con enzimas de reacción (EGFR Enzyme Mix) y un control Positivo (EGFR Positive Control) según se detalla a continuación: 1. 19-Del Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 2. L858R Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 3. T790M Reaction Mix: un vial con 700 µL

conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 4. Insertions Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 5. G719A/G719C Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 6. G719S Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 7. S768I Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 8. L861Q Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 9. External Control Reaction Mix: un vial con 700 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. EGFR Positive Control: un vial con 500 µL conteniendo plásmido de ADN (gen recombinante con mutaciones de EGFR) como control positivo. 10. EGFR Enzyme Mix: un vial con 80 µL conteniendo de enzimas ADN Taq polimerasa y uracil-Nglicosilasa. 11. 8.01.20201X024E; 24 pruebas (para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT, ABI StepOnePlus, LightCycler 480, Bio-Rad CFX96, SLAN-96S). El kit está compuesto por ocho viales con mezcla de reacción (Reaction Mix), un vial con enzimas de reacción (EGFR Enzyme Mix) y un control Positivo (EGFR Positive Control) según se detalla a continuación: 1. 19-Del Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 2. L858R Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 3. T790M Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 4. Insertions Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 5. G719X Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 6. S768I Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 7. L861Q Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. 8. External Control Reaction Mix: un vial con 1000 µL conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. EGFR Enzyme Mix: un vial con 85 µL conteniendo de enzimas ADN Taq polimerasa y uracil-Nglicosilasa. 9. EGFR Positive Control: un vial con 500 µL conteniendo plásmido de ADN (gen recombinante con mutaciones de EGFR) como control positivo. 10. 8.01.20201W010A; 10 pruebas (para Stratagene Mx3000P™, ABI7300, ABI7500, ABI7900HT). 8.01.20201W010B; 10 pruebas (para LightCycler480, Bio-Rad CFX96). 8.01.20201W010D; 10 pruebas (para SLAN-96S). Estos kits están compuestos por: 1) EGFR Reaction Mix: 12 tiras de 8 pocillos* conteniendo cebadores, sondas, Mg²⁺ y dNTPs. Cada tira (8- pocillos) incluye el siguiente contenido para analizar una muestra o un control (Tabla 1) * 2) EGFR Positive Control: un vial por 250 µl conteniendo Control Positivo para EGFR (plásmido de ADN). 3) EGFR Enzyme Mix: un vial por 45 µl conteniendo enzima ADN Taq polimerasa y uracil-N-glicosilasa.

PERÍODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE PRESENTACIÓN: 12 (DOCE) meses. Todo el contenido del kit debe almacenarse inmediatamente después de su recepción a -20 ± 5 °C y protegerse de la luz.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: Amoy Diagnostics Co., Ltd. (39 Dingshan Road, Haicang District, Xiamen 361027, China).

CONDICIÓN DE VENTA/CATEGORÍA: Venta exclusiva a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del **PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM-1252-206**

Nº EX-2021-56396600-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.08.04 13:33:22 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.08.04 13:33:23 -03:00