



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Disposición

Número:

Referencia: EX-2021-56181588-APN-DGA#ANMAT

VISTO el expediente N° EX-2021-56181588-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® KRAS 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 de los productos médicos 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 1°.- 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*: **AmoyDx® KRAS Mutations Detection Kit** de acuerdo con lo solicitado por TECNOLAB S.A., con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2°.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulos y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2022-45634695-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3°.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM 1252-209”, con exclusión de toda otra leyenda no autorizada y/o contemplada en la normativa vigente.

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

ARTÍCULO 5°.- Regístrese. Inscríbese 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 4°. 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® KRAS Mutations Detection Kit.

MODELO: MODELO: 8.01.20102X024H (24 pruebas para uso en los siguientes instrumentos: Stratagene Mx3000P™, ABI7500, LightCycler480, Bio-Rad CFX96, Rotor-Gene Q/6000 y SLAN-96S).

8.01.20102W006A (6 pruebas para Stratagene Mx3000P™, ABI 7500).

8.01.20102W006B (6 pruebas para LightCycler480).

8.01.20102W006D (6 pruebas Para SLAN-96S).

INDICACIÓN DE USO: Ensayo de PCR en tiempo real para la detección cualitativa de 19 mutaciones somáticas en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 del gen KRAS en el ADN genómico humano extraído de tejido embebido en parafina y fijado con formalina (FFPE). El kit está diseñado para evaluar el estado de la mutación de KRAS en pacientes con cáncer colorrectal.

FORMA DE PRESENTACIÓN: Descripción de los componentes del kit:

1) KRAS19 Reaction Mix incluye sistemas de viales conteniendo control interno y un sistema detección de mutaciones que incluye Mg²⁺, dNTPs, cebadores y sondas específicas para determinadas mutaciones KRAS

marcadas con FAM, que se utilizan para detectar el estado de la mutación KRAS. El sistema de control interno contiene cebadores y una sonda marcada con HEX para una región del ADN genómico adyacente al gen KRAS, que se utiliza para detectar la presencia de inhibidores y monitorear la precisión de la operación experimental.

2) KRAS19 External Control Reaction Mix contiene cebadores y una sonda marcada con FAM para una región de ADN genómico adyacente al gen KRAS, que se utiliza para evaluar la calidad del ADN.

3) KRAS19 Positive Control (PC) contiene un gen recombinante con mutaciones de KRAS.

4) KRAS19 Enzyme Mix contiene la Taq ADN polimerasa para amplificación por PCR y uracil-N-glicosilasa que funciona a temperatura ambiente para evitar la contaminación por arrastre de amplicones de PCR.

El kit está compuesto por 12 mezclas de reacción (KRAS19 Reaction Mix y KRAS19 External Control Reaction Mix), control positivo y mezcla de enzimas en cantidad suficiente para 24 determinaciones (8.01.20102X024H) o para 6 determinaciones (8.01.20102W006A/B/D).

Contenido del kit código N° 8.01.20102X024H

1. KRAS19 Reaction Mix 1: 1 x 1200 µL.

2. KRAS19 Reaction Mix 2: 1 x 1200 µL.

3. KRAS19 Reaction Mix 3: 1 x 1200 µL.

4. KRAS19 Reaction Mix 4: 1 x 1200 µL.

5. KRAS19 Reaction Mix 5: 1 x 1200 µL.

6. KRAS19 Reaction Mix 6: 1 x 1200 µL.

7. KRAS19 Reaction Mix 7: 1 x 1200 µL.

8. KRAS19 Reaction Mix 8: 1 x 1200 µL.

9. KRAS19 Reaction Mix 9: 1 x 1200 µL.

10. KRAS19 Reaction Mix 10: 1 x 1200 µL.

11. KRAS19 Reaction Mix 11: 1 x 1200 µL.

12. KRAS19 External Control: 1 x 1200 µL.

KRAS19 Enzyme Mix: 1 x 140 µL.

KRAS19 Positive Control: 2 x 500 µL.

Contenido del kit código N° 8.01.20102W006A/B/D:

KRAS19 Enzyme Mix: 1 x 40 µL.

KRAS19 Positive Control: 1 x 500 µL.

KRAS19 Reaction Mix: 8 tiras de 12 tubos/pocillos cada una. Cada tira de 12 tubos contiene el siguiente contenido para analizar una muestra o un control:

1. KRAS19 Reaction Mix 1: 35 µL.
2. KRAS19 Reaction Mix 2: 35 µL.
3. KRAS19 Reaction Mix 3: 35 µL.
4. KRAS19 Reaction Mix 4: 35 µL.
5. KRAS19 Reaction Mix 5: 35 µL.
6. KRAS19 Reaction Mix 6: 35 µL.
7. KRAS19 Reaction Mix 7: 35 µL.
8. KRAS19 Reaction Mix 8: 35 µL.
9. KRAS19 Reaction Mix 9: 35 µL.
10. KRAS19 Reaction Mix 10: 35 µL.
11. KRAS19 Reaction Mix 11: 35 µL.
12. KRAS19 External Control Reaction Mix: 35 µL.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 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 USO/CATEGORÍA: Venta exclusiva a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Nº EX-2021-56181588-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by GARAY Valéria Teresa
Date: 2022.10.04 14:39:32 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.10.04 14:39:41 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: EX-2021-56181588-APN-DGA#ANMAT

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS MEDICOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

Nº EX-2021-56181588-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), de un nuevo producto médico para diagnóstico in vitro con los siguientes datos identificatorios característicos:

NOMBRE COMERCIAL: AmoyDx® KRAS Mutations Detection Kit.

MODELO: 8.01.20102X024H (24 pruebas para uso en los siguientes instrumentos: Stratagene Mx3000P™, ABI7500, LightCycler480, Bio-Rad CFX96, Rotor-Gene Q/6000 y SLAN-96S).

8.01.20102W006A (6 pruebas para Stratagene Mx3000P™, ABI 7500).

8.01.20102W006B (6 pruebas para LightCycler480).

8.01.20102W006D (6 pruebas Para SLAN-96S).

INDICACIÓN DE USO: Ensayo de PCR en tiempo real para la detección cualitativa de 19 mutaciones somáticas en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 del gen KRAS en el ADN genómico humano extraído de tejido embebido en parafina y fijado con formalina (FFPE). El kit está diseñado para evaluar el estado de la mutación de KRAS en pacientes con cáncer colorrectal.

FORMA DE PRESENTACIÓN: Descripción de los componentes del kit:

1) KRAS19 Reaction Mix incluye sistemas de viales conteniendo control interno y un sistema de detección de mutaciones que incluye Mg²⁺, dNTPs, cebadores y sondas específicas para determinadas mutaciones KRAS marcadas con FAM, que se utilizan para detectar el estado de la mutación KRAS. El sistema de control interno contiene cebadores y una sonda marcada con HEX para una región del ADN genómico adyacente al gen KRAS, que se utiliza para detectar la presencia de inhibidores y monitorear la precisión de la operación experimental.

2) KRAS19 External Control Reaction Mix contiene cebadores y una sonda marcada con FAM para una región de ADN genómico adyacente al gen KRAS, que se utiliza para evaluar la calidad del ADN.

3) KRAS19 Positive Control (PC) contiene un gen recombinante con mutaciones de KRAS.

4) KRAS19 Enzyme Mix contiene la Taq ADN polimerasa para amplificación por PCR y uracil-N-glicosilasa que funciona a temperatura ambiente para evitar la contaminación por arrastre de amplicones de PCR.

El kit está compuesto por 12 mezclas de reacción (KRAS19 Reaction Mix y KRAS19 External Control Reaction Mix), control positivo y mezcla de enzimas en cantidad suficiente para 24 determinaciones (8.01.20102X024H) o para 6 determinaciones (8.01.20102W006A/B/D).

Contenido del kit código N° 8.01.20102X024H

1. KRAS19 Reaction Mix 1: 1 x 1200 µL.

2. KRAS19 Reaction Mix 2: 1 x 1200 µL.

3. KRAS19 Reaction Mix 3: 1 x 1200 µL.

4. KRAS19 Reaction Mix 4: 1 x 1200 µL.

5. KRAS19 Reaction Mix 5: 1 x 1200 µL.

6. KRAS19 Reaction Mix 6: 1 x 1200 µL.

7. KRAS19 Reaction Mix 7: 1 x 1200 µL.

8. KRAS19 Reaction Mix 8: 1 x 1200 µL.

9. KRAS19 Reaction Mix 9: 1 x 1200 µL.

10. KRAS19 Reaction Mix 10: 1 x 1200 µL.

11. KRAS19 Reaction Mix 11: 1 x 1200 µL.

12. KRAS19 External Control: 1 x 1200 µL.

KRAS19 Enzyme Mix: 1 x 140 µL.

KRAS19 Positive Control: 2 x 500 µL.

Contenido del kit código N° 8.01.20102W006A/B/D:

KRAS19 Enzyme Mix: 1 x 40 µL.

KRAS19 Positive Control: 1 x 500 µL.

KRAS19 Reaction Mix: 8 tiras de 12 tubos/pocillos cada una. Cada tira de 12 tubos contiene el siguiente contenido para analizar una muestra o un control:

1. KRAS19 Reaction Mix 1: 35 µL.
2. KRAS19 Reaction Mix 2: 35 µL.
3. KRAS19 Reaction Mix 3: 35 µL.
4. KRAS19 Reaction Mix 4: 35 µL.
5. KRAS19 Reaction Mix 5: 35 µL.
6. KRAS19 Reaction Mix 6: 35 µL.
7. KRAS19 Reaction Mix 7: 35 µL.
8. KRAS19 Reaction Mix 8: 35 µL.
9. KRAS19 Reaction Mix 9: 35 µL.
10. KRAS19 Reaction Mix 10: 35 µL.
11. KRAS19 Reaction Mix 11: 35 µL.
12. KRAS19 External Control Reaction Mix: 35 µL.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 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 USO/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 1252-209.**

N° EX-2021-56181588-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.10.04 14:34:47 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.10.04 14:34:47 -03:00



PROYECTO DE RÓTULOS EXTERNOS - AmoyDx® KRAS Mutation Detection Kit

Código: 8.01.20102X024H (24 pruebas).

Para utilizar con instrumentos: Stratagene Mx3000P™, ABI7500, LightCycler480, Bio-Rad CFX96, Rotor-Gene Q/6000 y SLAN-96S.

AmoyDx® KRAS Mutation Detection Kit
Real-time PCR

ADx-ARMS®

Σ 24 ⓘ

REF 8.01.20102X024H
LOT XXXXXXXXXXXXX
1990-01-31



(01) 06959094206154
(17) 900131
(10) XXXXXXXXXXXXX
(21) 458814

-25°C -15°C

ADx-KR07

CE IVD
EC REP Garad 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-1252-209

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

Director Técnico
Firma y Sello



Código: 8.01.20102W006A (6 pruebas).

Para utilizar con instrumentos: Stratagene Mx3000P™, ABI7500.

AmoyDx® *KRAS* Mutation Detection Kit

Real-time PCR

ADx-ARMS®

REF 8.01.20102W006A

LOT XXXXXXXXXXXXX

1990-01-31

ADx-KR05

For Mx3000P,ABI7500



(01) 06959094206147
(17) 900131
(10) XXXXXXXXXXXXX
(21) 190762

Σ 6

-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-1252-209

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


Director Técnico
Firma y Sello





Código: 8.01.20102W006B (6 pruebas).
Para utilizar con instrumentos: LightCycler480




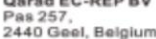
AmoyDx® KRAS Mutation Detection Kit ADx-ARMS®
Real-time PCR

REF 8.01.20102W006B
LOT XXXXXXXXXXXXX
1990-01-31
ADx-KR05
For LC480



(01) 06959094206147
(17) 900131
(10) XXXXXXXXXXXXX
(21) 133168

 
-25°C -15°C

 
 
Garad 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-1252-209

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

Director Técnico
Firma y Sello



Código: 8.01.20102W006D (6 pruebas).
Para utilizar con instrumentos: SLAN-96S

AmoyDx® KRAS Mutation Detection Kit ADx-ARMS®
Real-time PCR

REF 8.01.20102W006D
LOT XXXXXXXXXXXXX
1990-01-31
ADx-KR05
For SLAN



(01) 06959094206147
(17) 900131
(10) XXXXXXXXXXXXX
(21) 376978

 6 
 -25°C -15°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-1252-209


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

Director Técnico
Firma y Sello



PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS

Códigos: 8.01.20102W006H

KRAS¹⁹ 反应液 1
KRAS¹⁹ Reaction Mix 1
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 反应液 2
KRAS¹⁹ Reaction Mix 2
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 反应液 3
KRAS¹⁹ Reaction Mix 3
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 反应液 4
KRAS¹⁹ Reaction Mix 4
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 反应液 5
KRAS¹⁹ Reaction Mix 5
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 反应液 6
KRAS¹⁹ Reaction Mix 6
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 反应液 7
KRAS¹⁹ Reaction Mix 7
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

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

Director Técnico
Firma y Sello



KRAS¹⁹ 反应液 8
KRAS¹⁹ Reaction Mix 8
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 反应液 9
KRAS¹⁹ Reaction Mix 9
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 反应液 10
KRAS¹⁹ Reaction Mix 10
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 反应液 11
KRAS¹⁹ Reaction Mix 11
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 外控反应液
KRAS¹⁹ External Control Reaction Mix
规格Quantity: 1200 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 混合酶
KRAS¹⁹ Enzyme Mix
规格Quantity: 140 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

KRAS¹⁹ 阳性对照
KRAS¹⁹ Positive Control
规格Quantity: 500 µL
批号 **LOT** 011160624002
AmoyDx®
2017-08-03
有效期至

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

Director Técnico
Firma y Sello



Códigos: 8.01.20102W006A/B/D

KRAS¹⁹ PCR反应条 AmoyDx®
KRAS¹⁹ Reaction Mix
批号 **LOT** 011160624002 有效期至 2017-08-03

KRAS¹⁹ 混合酶 AmoyDx®
KRAS¹⁹ Enzyme Mix
规格Quantity: 40 µL 有效期至 2017-08-03
批号 **LOT** 011160624002

KRAS¹⁹ 阳性对照 AmoyDx®
KRAS¹⁹ Positive Control
规格Quantity: 250 µL 有效期至 2017-08-03
批号 **LOT** 011160624002

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

Director Técnico
Firma y Sello



AmoyDx[®] KRAS Mutation Detection Kit

Detección de 19 mutaciones en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de KRAS

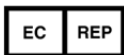
Instrucciones de Uso

REF 8.01.20102X024H 24 pruebas

Para Stratagene Mx3000P[™], ABI7500, LightCycler480, Bio-Rad CFX96, Rotor-Gene Q/6000 (72 pocillos), SLAN-96S



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



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

Antecedentes

La proteína KRAS es una GTPasa y una de las moléculas clave en la vía de señalización descendente del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La proteína KRAS transduce señales de receptores unidos a la membrana a través de múltiples vías efectoras descendentes y, por lo tanto, afecta los procesos celulares fundamentales, incluida la proliferación, la apoptosis y la diferenciación. En total, las mutaciones activadoras en los genes KRAS ocurren en el 15 ~ 30% del cáncer de pulmón y el 20 ~ 50% del cáncer colorrectal, principalmente en los exones 2, 3 o 4. El estado de mutación del gen KRAS es relevante para la resistencia primaria a los medicamentos de cánceres colorrectales tratados con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Los pacientes con el gen KRAS de tipo salvaje podrían beneficiarse de Erbitux (Cetuximab) o Vectibix (Panitumumab), mientras que los pacientes con el gen KRAS mutante muestran una mala respuesta a este tratamiento.

Uso Previsto

El AmoyDx® KRAS Mutation Detection Kit es un ensayo de PCR en tiempo real para la detección cualitativa de 19 mutaciones somáticas en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 del gen KRAS en el ADN genómico humano extraído de la parafina fijada con formalina (FFPE) tejido tumoral. El kit está diseñado para evaluar el estado de la mutación de KRAS en pacientes con cáncer colorrectal.

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 de sistema de mutación refractaria de amplificación (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 dirigido 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 12 mezclas de reacción (KRAS¹⁹ Reaction Mix 1~11 y KRAS¹⁹ External Control Reaction Mix), suficiente control positivo y mezcla de enzimas.

- 1) El **KRAS¹⁹ Reaction Mix 1~11** incluye sistemas de control interno y detección de mutaciones. El sistema de detección de mutaciones incluye cebadores y sondas marcadas con FAM específicos para denominadas mutaciones KRAS, que se utilizan para detectar el estado de la mutación KRAS. El sistema de control interno contiene cebadores y una sonda marcada con HEX para una región del ADN genómico adyacente al gen KRAS, que se utiliza para detectar la presencia de inhibidores y monitorear la precisión de la operación experimental.
- 2) El **KRAS¹⁹ External Control Reaction Mix** contiene cebadores y una sonda marcada con FAM para una región de ADN genómico adyacente al gen KRAS, que se utiliza para evaluar la calidad del ADN.
- 3) El **KRAS¹⁹ Positive Control (PC)** contiene un gen recombinante con mutaciones de KRAS.
- 4) La **KRAS¹⁹ Enzyme Mix** contiene la 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

Este kit contiene los siguientes materiales:

Tabla 1 Contenido del Kit

Contenido	Ingredientes Principales	Cantidad
KRAS¹⁹ Reaction Mix	12-tube strip*	8 strips
KRAS¹⁹ Enzyme Mix	Taq DNA Polymerase, Uracil-N-Glycosylase	40 µL/tube ×1
KRAS¹⁹ Positive Control	Plasmid DNA	250 µL/tube ×1

* Cada tira de 12 tubos incluye el siguiente contenido para analizar una muestra o un control (Tabla 2).



Tabla 2 Información de la tira de 12 tubos

No. de Tubo	Reactivo	Ingredientes Principales	Cantidad	Señal Fluorescente
①	KRAS¹⁹ Reaction Mix 1	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
②	KRAS¹⁹ Reaction Mix 2	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
③	KRAS¹⁹ Reaction Mix 3	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
④	KRAS¹⁹ Reaction Mix 4	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑤	KRAS¹⁹ Reaction Mix 5	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑥	KRAS¹⁹ Reaction Mix 6	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑦	KRAS¹⁹ Reaction Mix 7	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑧	KRAS¹⁹ Reaction Mix 8	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑨	KRAS¹⁹ Reaction Mix 9	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑩	KRAS¹⁹ Reaction Mix 10	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑪	KRAS¹⁹ Reaction Mix 11	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑫	KRAS¹⁹ External Control Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM

Nota:

Distinga el tubo ⑫ del tubo ① según el extremo trapezoidal del borde de la tira, que se describe a continuación.



Almacenamiento y Estabilidad

El kit requiere envío en frío. Todos los componentes del kit deben almacenarse inmediatamente después de recibirlos a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ y protegido de la luz.

La vida útil de el 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™, ABI7500, LightCycler480, Bio-Rad CFX96, Rotor-Gene Q / 6000 (72 pocillos) o SLAN-96S.
- Kit de extracción de ADN: recomendamos utilizar el kit de extracción de ADN (AmoyDx® FFPE DNA Kit, Cat No.: 8.02.23501X036G).
- Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN.
- Mini centrífuga con rotor para tubos de centrífuga.
- Mini centrífuga con rotor para tubos PCR.
- Tubos de centrífuga sin nucleasas.
- Tubos y tapas para PCR sin nucleasas.
- Pipetas ajustables y puntas de pipeta filtradas para manipular ADN.
- Gradillas para tubos.
- Guantes desechables sin polvo.
- Agua esterilizada sin nucleasas.
- $1 \times$ 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.
- Como todos los productos químicos tienen un riesgo potencial, solo los profesionales capacitados pueden usar 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 μ L.
- 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 el instrumento LightCycler480 I, es necesario realizar una calibración de fluorescencia antes de su uso. Si hay un cruce de fluorescencia en el instrumento LightCycler480 II, también se requiere la calibración de fluorescencia. Para ejecutar los ensayos en una máquina LightCycler, 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 tumoral FFPE. 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 KRAS detectables. Es mejor usar muestras de tejido tumoral con más del 30% de células tumorales.

El valor de DO_{260} / DO_{280} del ADN extraído 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 difiere según el tiempo de almacenamiento diferente (véase la Tabla 2).

Tabla 2 Concentración recomendada de ADN

Tejido	Tiempo de almacenamiento	Concentración de ADN	Cantidad de ADN por reacción
Tejido FFPE	≤ 3 meses	1,5 ng / μL	7,05 ng
	> 3 meses & ≤ 1 año	2 ng / μL	9,4 ng
	> 1 año & ≤ 3 años	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.
- El ADN extraído debe utilizarse inmediatamente. Si no, debe almacenarse a -20 ± 5 °C durante no más de 6 meses.
- Antes de la detección, diluya el ADN de tejido extraído con $1 \times TE$ buffer (pH 8,0) a 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) Descongele **KRAS¹⁹ Reaction Mix 1~11**, **KRAS¹⁹ External Control Reaction Mix** y **KRAS¹⁹ PC** a temperatura ambiente. Cuando los reactivos se hayan descongelado completamente, invierta el tubo 10 veces y centrifugue brevemente para recoger todo el líquido en el fondo del tubo.
- 2) Centrifugue brevemente la **KRAS¹⁹ Enzyme Mix** antes de usarla.
- 3) Prepare suficiente **KRAS¹⁹ Master Mix 1~12** que contenga la **KRAS¹⁹ Enzyme Mix** y cada **KRAS¹⁹ Reaction Mix** (**KRAS¹⁹ Reaction Mix 1~11** o **KRAS¹⁹ External Control Reaction Mix**, respectivamente) en un tubo de centrifuga, estéril separado de acuerdo con la proporción de la Tabla 3. Mezclar bien cada **KRAS** Master Mix pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo durante más de 10 veces y centrifugar brevemente.

Tabla 3 **KRAS¹⁹ Master Mix**

Contenido	Volumen por prueba
Reaction Mix	35 μL
KRAS¹⁹ Enzyme Mix	0.3 μL
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.
- 4) Extraiga el ADN de la muestra (véase la Tabla 2 para conocer la concentración de ADN) y el agua sin nucleasas para el NTC.
 - 5) Prepare 12 tubos de PCR para NTC: dispense 35,3 μL de **KRAS¹⁹ Master Mix 1~12** en cada tubo de PCR, respectivamente. A continuación, agregue 4,7 μL de agua sin nucleasas a cada tubo de PCR y tape los tubos de PCR.
 - 6) Prepare 12 tubos de PCR para cada muestra: dispense 35,3 μL de **KRAS¹⁹ Master Mix 1~12** en cada tubo de PCR, respectivamente. A continuación, agregue 4,7 μL de muestra de ADN a cada tubo de PCR y tape los tubos de PCR.
 - 7) Prepare 12 tubos de PCR para PC: dispense 35,3 μL de **KRAS¹⁹ Master Mix 1~12** en cada tubo de PCR, respectivamente. A

continuación, agregue 4,7 µL de control positivo KRAS19 a cada tubo de PCR y tape los tubos de PCR.

- 8) Centrifugue brevemente los tubos de PCR para recoger todo el líquido en el fondo de cada tubo de PCR.
- 9) 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 recomendado

Fila	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1
B	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2
C	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3
D	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4
E	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5
F	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6
G	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

- 10) Configure el Protocolo de PCR utilizando los parámetros de ciclo de la Tabla 5.
- 11) Inicie el ciclo de PCR inmediatamente.
- 12) Cuando finalice la serie de 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 ①~⑪ debe ser ≥ 31 . Si no, los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 2) Para Control Positivo: los valores FAM Ct de los tubos ①~⑫ y valores Ct HEX / VIC de los tubos ①~⑪ debiera ser < 20 . Si no, los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 3) Para el ensayo de control interno en tubos ①~⑪ para cada muestra: Los valores HEX / VIC Ct de Tubes ①~⑪ debiera ser < 31 . Si no, verifique las señales FAM de Tubes ①~⑪ :
 - a) Si el valor Ct de FAM mutante es < 31 , continuar con el análisis.
 - b) Si el valor Ct de FAM mutante es ≥ 31 , los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 4) Para el control externo ensayo en tubo ⑫ para cada muestra:
 - a) El valor de FAM Ct debe estar entre 15 ~ 21.
 - b) Si el valor de FAM Ct es < 15 , esto indica que el ADN está sobrecargado. La cantidad de ADN debe reducirse y volverse a analizar. Pero si los valores FAM Ct de Tubes ①~⑪ están en el rango Ct negativo (véase Tabla 6), la muestra se determina como negativa.
 - c) Si el valor de FAM Ct es > 21 , 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 algún valor FAM Ct de los tubos ①~⑪ es < 26 , la muestra se determina como positiva.



Analice el ensayo de mutación para cada muestra:

- 5) Registre los valores de Ct de FAM mutante de los tubos ①~⑪ para cada muestra.
- 6) Compruebe los valores de Ct de FAM mutante de los tubos ①~⑪ de acuerdo con la Tabla 6:
 - a) Si cualquier valor FAM Ct de Tube ①~⑪ es < 26 , la muestra se determina como positiva (se detecta la mutación KRAS).
 - b) Si cualquier valor FAM Ct de Tube ①~⑪ está en el rango de Ct aceptable, calcular 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 menor que el valor de ΔCt de corte correspondiente, la muestra se determina como positiva (mutación detectada).
 - iii. Si el valor de ΔCt es igual o mayor que el valor de ΔCt de corte correspondiente, la muestra se determina como negativa (sin mutación detectada) o por debajo del LOD del kit.
- c) Si todos los valores FAM Ct de Tubes ①~⑪ están en el rango Ct negativo o no hay amplificación, la muestra se determina como negativa (No se detectó mutación) o por debajo del LOD del kit.

Tabla 6 Determinación de Resultados

No. de Tubo	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	Resultados
Óptimo Rango de Ct	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Positivo.
Rango de Ct aceptable	26 ≤ Ct <28	26 ≤ Ct <29	26 ≤ Ct <28	26 ≤ Ct <29	26 ≤ Ct <29	26 ≤ Ct <28	26 ≤ Ct <29	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	9	10	11	10	9	10	9	10	9	10	9	
Rango de Ct negativo	Ct ≥ 28	Ct ≥ 29	Ct ≥ 28	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 28	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Negativo o por debajo del LOD*.

* LOD: límite de detección

- 7) Puede producirse cierta reactividad cruzada entre las reacciones de mutación de KRAS. Si se detecta una mutación positiva fuerte, algunas de las otras reacciones de mutación también pueden dar una curva positiva. Si se detectan dos o más de las 19 mutaciones, la que tenga el valor de Ct más pequeño se determina como verdadera positiva. Compruebe el valor de ΔCt de otras mutaciones para determinar el resultado (véase la Tabla 7).
- a) Si el valor de ΔCt es menor que el valor de corte de reactividad cruzada, la curva positiva se determina como verdadera positiva. Una muestra puede detectarse con una o más mutaciones de KRAS.
 - b) Si el valor de ΔCt es mayor o igual que el valor de corte de reactividad cruzada, el resultado se determina como negativo.

Tabla 7 Valor de ΔCt de corte de reactividad cruzada

Tube No. Mutation Name	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
KRAS-M1	-	-	-	-	-	9.06	-	-	-	-
KRAS-M2	-	-	11.3	-	10.68	7.53	-	-	-	-
KRAS-M3	-	11.87	-	-	-	7.52	-	-	-	-
KRAS-M4	12.8	-	11.37	-	9.7	10.83	-	-	-	-
KRAS-M5	-	-	-	12.58	-	5.58	-	-	-	-
KRAS-M6	-	-	-	-	12.09	-	-	-	-	-
KRAS-M7	10.98	-	-	12.14	-	10.64	-	-	-	-
KRAS-M19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.8
KRAS-M15	-	-	-	-	-	-	-	-	8.21	-

Note: "-" símbolo de no reactividad cruzada.

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

Características de presentación

Las características de rendimiento de este kit se validaron en Stratagene Mx3000P™, ABI7500, LightCycler480, Bio-Rad CFX96, Rotor-Gene Q / 6000 (72 pocillos) y SLAN-96S.

1) Límite de detección:

- Para Stratagene Mx3000P™, 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.
- Para otros instrumentos de PCR, 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. Excepto: la sensibilidad de las mutaciones KRAS-M16 y KRAS-M18 es del 2% a una cantidad de muestra de ADN de 10 ng, la sensibilidad de las mutaciones de KRAS-M20, KRAS-M22 y KRAS-M23 es del 5% 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 precisión del kit se estableció probando 11 controles de referencia positivos. La prueba dio resultados positivos y la tasa de concordancia positiva fue del 100%.

4) Factor de interferencia:

En este estudio se evaluaron 4 sustancias de interferencia comunes: hemoglobina, triglicéridos, mycobacterium tuberculosis y neumonía por estreptococo que están fácilmente presentes en las muestras de FFPE. Se confirma que las concentraciones máximas potenciales: 2 mg / ml de hemoglobina, 37 mmol / L de triglicéridos, 106 UFC / ml de mycobacterium tuberculosis y 106 UFC / ml de neumonía por estreptococo no interferirían con el resultado de la prueba.

5) Precisión:

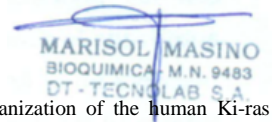
En la validación se utilizaron 3 controles de precisión: control negativo, control positivo débil (el contenido de mutante es 5%) y control positivo fuerte (el contenido de mutante es 50%). Se probaron 3 lotes de los kits con los controles de precisión por 2 operadores dos veces al día durante 20 días en diferentes instrumentos de PCR. Se calcularon los valores de Ct, los valores de CV estaban todos dentro del 10%.

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 de tejido tumoral FFPE.
- 4) Se observó reactividad de Ross con la mutación KRAS G12F en KRAS^{T9} Reaction Mix 6, que representa ~ 0,48% de los pacientes con cáncer de pulmón.
- 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 de KRAS.
- 7) Las muestras con resultado negativo (sin mutación detectada) pueden albergar mutaciones de KRAS no detectadas por este ensayo.

Referencias

- 1) FDA website: <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm 172905.htm>.
- 2) McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV, Levinson AD, 1983. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. Nature 304 (5926): 501-6.
- 3) Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al.2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res. 66 (8): 3992-5.
- 4) James RM, Arends MJ, Plowman SJ, et al.2003. KRAS Proto-Oncogene exhibits tumor suppressor activity as its absence promotes tumorigenesis in Murine Teratomas. Mol Cancer Res. 1: 820-5.
- 5) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al.2013. Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer.The New England Journal of Medicine, 369 (11): 1023-34.
- 6) Rook WD, Jonker DJ, Nicolantonio FD, et al.2010. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. JAMA, 304(16): 1812-1820.



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 KRAS detectadas por el Kit

No. de Tubo	Reactivo	Exón	Mutación	Cambio de Base	Cosmic ID	Nombre
①	KRAS ^{G12D} Reaction Mix 1	2	G12D	35G>A	521	KRAS-M1
②	KRAS ^{G12A} Reaction Mix 2	2	G12A	35G>C	522	KRAS-M2
③	KRAS ^{G12V} Reaction Mix 3	2	G12V	35G>T	520	KRAS-M3
④	KRAS ^{G12S} Reaction Mix 4	2	G12S	34G>A	517	KRAS-M4
⑤	KRAS ^{G12R} Reaction Mix 5	2	G12R	34G>C	518	KRAS-M5
⑥	KRAS ^{G12C} Reaction Mix 6	2	G12C	34G>T	516	KRAS-M6
⑦	KRAS ^{G13D} Reaction Mix 7	2	G13D	38G>A	532	KRAS-M7
⑧	KRAS ^{G13C} Reaction Mix 8	2	G13C	37G>T	527	KRAS-M14
⑨	KRAS ^{A59T} Reaction Mix 9	3	A59T	175G>A	546	KRAS-M25
			Q61K	181C>A	549	KRAS-M19
			Q61L	182A>T	553	KRAS-M15
⑩	KRAS ^{Q61R} Reaction Mix 10	3	Q61R	182A>G	552	KRAS-M16
			Q61H	183A>C	554	KRAS-M17
			Q61H	183A>T	555	KRAS-M18
			K117N	351A>C	19940	KRAS-M20
⑪	KRAS ^{K117N} Reaction Mix 11	4	K117N	351A>T	28519	KRAS-M21
			A146T	436G>A	19404	KRAS-M22
			A146V	437C>T	19900	KRAS-M23
			A146P	436G>C	19905	KRAS-M24



AmoyDx[®] KRAS Mutation Detection Kit

Detección de 19 mutaciones en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de KRAS

Instrucciones de Uso

REF	8.01.20102W006A	6 pruebas	Para Stratagene Mx3000P™, ABI 7500
REF	8.01.20102W006B	6 pruebas	Para LightCycler480
REF	8.01.20102W006D	6 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
E-mail: sales@amoydx.com
Website: <http://www.amoydx.com>

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



Qarad EC-REP BV
Pas 257
2440 Geel, Belgium

Antecedentes

La proteína KRAS es una GTPasa y una de las moléculas clave en la vía de señalización descendente del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La proteína KRAS transduce señales de receptores unidos a la membrana a través de múltiples vías efectoras descendentes y, por lo tanto, afecta los procesos celulares fundamentales, incluida la proliferación, la apoptosis y la diferenciación. En total, las mutaciones activadoras en los genes KRAS ocurren en el 15 ~ 30% del cáncer de pulmón y el 20 ~ 50% del cáncer colorrectal, principalmente en los exones 2, 3 o 4. El estado de mutación del gen KRAS es relevante para la resistencia primaria a los medicamentos de cánceres colorrectales tratados con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Los pacientes con el gen KRAS de tipo salvaje podrían beneficiarse de Erbitux (Cetuximab) o Vectibix (Panitumumab), mientras que los pacientes con el gen KRAS mutante muestran una mala respuesta a este tratamiento.

Uso Previsto

El AmoyDx® KRAS Mutation Detection Kit es un ensayo de PCR en tiempo real para la detección cualitativa de 19 mutaciones somáticas en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 del gen KRAS en el ADN genómico humano extraído de la parafina fijada con formalina (FFPE) tejido tumoral. El kit está diseñado para evaluar el estado de la mutación de KRAS en pacientes con cáncer colorrectal.

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 de sistema de mutación refractaria de amplificación (ARMS) que comprende cebadores específicos y fluorescentes sondas para detectar mutaciones genéticas en un ensayo de PCR en tiempo real. Durante la amplificación del ácido nucleico, el ADN mutante dirigido 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 12 mezclas de reacción (KRAS¹⁹ Reaction Mix 1~11 y KRAS¹⁹ External Control Reaction Mix), suficiente control positivo y mezcla de enzimas.

- 1) El **KRAS¹⁹ Reaction Mix 1~11** incluye sistemas de control interno y detección de mutaciones. El sistema de detección de mutaciones incluye cebadores y sondas marcadas con FAM específicos para denominadas mutaciones KRAS, que se utilizan para detectar el estado de la mutación KRAS. El sistema de control interno contiene cebadores y una sonda marcada con HEX para una región del ADN genómico adyacente al gen KRAS, que se utiliza para detectar la presencia de inhibidores y monitorear la precisión de la operación experimental.
- 2) El **KRAS¹⁹ External Control Reaction Mix** contiene cebadores y una sonda marcada con FAM para una región de ADN genómico adyacente al gen KRAS, que se utiliza para evaluar la calidad del ADN.
- 3) El **KRAS¹⁹ Positive Control (PC)** contiene un gen recombinante con mutaciones de KRAS.
- 4) La **KRAS¹⁹ Enzyme Mix** contiene la 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

Este kit contiene los siguientes materiales:

Tabla I Contenido del Kit

Contenido	Ingredientes Principales	Cantidad
KRAS¹⁹ Reaction Mix	12-tube strip*	8 strips
KRAS¹⁹ Enzyme Mix	Taq DNA Polymerase, Uracil-N-Glycosylase	40 µL/tube ×1
KRAS¹⁹ Positive Control	Plasmid DNA	250 µL/tube ×1

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

* Cada tira de 12 tubos incluye el siguiente contenido para analizar una muestra o un control (Tabla 2).

Tabla 2 Información de la tira de 12 tubos

No. de Tubo	Reactivo	Ingredientes Principales	Cantidad	Señal Fluorescente
①	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 1	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
②	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 2	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
③	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 3	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
④	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 4	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑤	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 5	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑥	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 6	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑦	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 7	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑧	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 8	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑨	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 9	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑩	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 10	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑪	<i>KRAS</i> ^{G9} Reaction Mix 11	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM, HEX/VIC
⑫	<i>KRAS</i> ^{G9} External Control Reaction Mix	Primers, Probes, Mg ²⁺ , dNTPs	35 µL	FAM

Nota:

Distinga el tubo ⑫ del tubo ① según el extremo trapezoidal del borde de la tira, que se describe a continuación.



Almacenamiento y Estabilidad

El kit requiere el envío en frío. Todos los componentes del kit deben almacenarse inmediatamente después de recibirlos a -20 ± 5 °C y protegerse de la luz.

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

Reactivos y Equipos Adicionales Requeridos, pero No Suministrados

- 1) Los instrumentos de PCR compatibles:
Stratagene Mx3000P™, ABI7500, LightCycler480 o SLAN-96S.
- 2) Kit de extracción de ADN: recomendamos utilizar el kit de extracción de ADN (AmoyDx® FFPE DNA Kit, Cat No.: 8.02.23501X036G).
- 3) Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN.
- 4) Mini centrífuga con rotor para tubos de centrífuga.
- 5) Mini centrífuga con rotor para tubos de PCR.
- 6) Tubos de centrífuga libres de nucleasas.
- 7) Pipetas ajustables y puntas de pipeta filtradas para manipular ADN.
- 8) Gradillas para tubos.
- 9) Guantes desechables sin polvo.
- 10) Agua estéril sin nucleasas.
- 11) 1 x TE buffer (pH 8,0).

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

Precauciones y Requisitos de Manipulación

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Precautions

- 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.
- Como todos los productos químicos tienen un riesgo potencial, solo los profesionales capacitados pueden usar 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 μ L.
- Para Stratagene Mx3000PTM, 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 el instrumento LightCycler480 I, es necesario realizar una calibración de fluorescencia antes de su uso. Si hay un cruce de fluorescencia en el instrumento LightCycler480 II, también se requiere la calibración de fluorescencia. Para ejecutar los ensayos en una máquina LightCycler, 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

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

El material de la muestra debe ser ADN genómico humano extraído de tejido tumoral FFPE. 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 KRAS detectables. Es mejor usar muestras de tejido tumoral con más del 30% de células tumorales.

El valor de DO_{260} / DO_{280} del ADN extraído 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 difiere según el tiempo de almacenamiento diferente (véase la Tabla 3).

Tabla 3 Concentración de ADN recomendada

Tejido	Tiempo de almacenamiento	Concentración de ADN	Cantidad de ADN por reacción
Tejido FFPE	≤ 3 meses	1,5 ng / μL	7,05 ng
	> 3 meses & ≤ 1 año	2 ng / μL	9,4 ng
	> 1 año & ≤ 3 años	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.
- El ADN extraído debe utilizarse inmediatamente. Si no, debe almacenarse a -20 ± 5 °C durante no más de 6 meses.
- Antes de la detección, diluya el ADN de tejido extraído con $1 \times TE$ buffer (pH 8,0) a la concentración designada. Recomendamos usar al menos 5 μL de ADN para diluir 10 veces, para asegurar la validez de la concentración final.

2. Mutation Detection Detección de Mutaciones

- 1) Saque el **KRAS¹⁹ PC** y **KRAS¹⁹ Enzyme Mix** del kit del congelador y los demás reactivos quedaron en el congelador a -20 ± 5 °C.
- 2) Descongele el **KRAS¹⁹ PC** a temperatura ambiente. Cuando los reactivos se hayan descongelado completamente, invierta el tubo 10 veces y centrifugue brevemente para recoger todo el líquido en el fondo del tubo.
- 3) Centrifugue brevemente la **KRAS¹⁹ Enzyme Mix** antes de usarla.
- 4) Extraiga la muestra de ADN (véase la Tabla 3 para ver la concentración de ADN) y el agua libre de nucleasas para NTC (sin control de plantilla).
- 5) Prepare la mezcla de NTC: pipetee 65,8 μL de agua sin nucleasas (NTC) y 4,2 μL de **KRAS¹⁹ Enzyme Mix** en un tubo de centrifuga. Mézclelos bien pipeteando arriba y abajo más de 10 veces.
- 6) Prepare la mezcla de muestra de ADN: pipetee 65,8 μL de cada muestra de ADN y 4,2 μL de **KRAS¹⁹ Enzyme Mix** en un tubo de centrifuga (véase la Tabla 3 para conocer la concentración de ADN). Mézclelos bien pipeteando arriba y abajo más de 10 veces.
- 7) Prepare la mezcla de control positivo (PC): pipetee 65,8 μL de control positivo KRAS y 4,2 μL de **KRAS¹⁹ Enzyme Mix** en un tubo de centrifuga. Mézclelos bien pipeteando arriba y abajo más de 10 veces.

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.
- 8) Saque la **KRAS¹⁹ Reaction Mix** (suficiente para muestras, PC y NTC) y centrifugue las tiras si hay gotitas de reactivo en las tapas de los tubos de PCR. Luego destape brevemente las tapas antes de usar.
 - 9) Añada 5 μL de la mezcla NTC preparada a cada tubo de PCR de la tira de NTC y tape los tubos de PCR.

- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Centrifugue brevemente los tubos de PCR para recoger todo el líquido en el fondo de cada tubo de PCR.
- 13) Coloque los tubos de PCR en las posiciones adecuadas del instrumento de PCR en tiempo real. En la Tabla 4 se muestra un diseño de placa recomendado.

Tabla 4 Diseño de placa de PCR recomendado

Fila	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1
B	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2
C	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 3
D	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4	Muestra 4
E	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5	Muestra 5
F	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6	Muestra 6
G	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

- 14) 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	/
		64°C	20s	/
2	15	72°C	20s	/
		93°C	25s	/
		60°C	35s	FAM y HEX/VIC
3	31	72°C	20s	/

- 15) Inicie el ciclo de PCR inmediatamente.
- 16) Cuando finalice la serie de 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 ①-⑪ debe ser ≥ 31 . Si no, los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse
- 2) Para Control Positivo: los valores FAM Ct de los tubos ①-⑫ y valores Ct HEX / VIC de los tubos ①-⑪ debiera ser < 20 . Si no, los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 3) Para el ensayo de control interno en tubos ①-⑪ para cada muestra: Los valores HEX / VIC Ct de Tubes ①-⑪ debiera ser < 31 . Si no, verifique las señales FAM de Tubes ①-⑪ :
 - a) Si el valor Ct de FAM mutante es < 31 , continuar con el análisis.
 - b) Si el valor Ct de FAM mutante es ≥ 31 , los datos son INVALIDOS. La muestra debe volver a analizarse.
- 4) Para el control externo ensayo en tubo ⑫ para cada muestra:
 - a) El valor de FAM Ct debe estar entre 15 ~ 21.
 - b) Si el valor de FAM Ct es < 15 , esto indica que el ADN está sobrecargado. La cantidad de ADN debe reducirse y volverse a analizar. Pero si los valores FAM Ct de Tubes ①-⑪ están en el rango Ct negativo (véase Tabla 6), la muestra se determina como negativa.
 - c) Si el valor de FAM Ct es > 21 , esto indica la degradación del ADN o la presencia de inhibidores de la PCR, o cualquier error en la

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

operación experimental. La muestra debe volver a analizarse con ADN aumentado o extraído nuevamente. Pero si algún valor FAM Ct de los tubos ①~⑪ es < 26, la muestra se determina como positiva.

Analice el ensayo de mutación para cada muestra:

- 5) Registre los valores de Ct de FAM mutante de los tubos ①~⑪ para cada muestra.
- 6) Compruebe los valores de Ct de FAM mutante de los tubos ①~⑪ de acuerdo con la Tabla 6:

Tabla 6 Determinación de Resultados

No. de Tubo	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	Resultados
Óptimo Rango de Ct	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Positivo.
Rango de Ct aceptable	26 ≤ Ct < 28	26 ≤ Ct < 29	26 ≤ Ct < 28	26 ≤ Ct < 29	26 ≤ Ct < 29	26 ≤ Ct < 28	26 ≤ Ct < 29	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	9	10	11	10	9	10	9	10	9	10	9	
Rango de Ct negativo	Ct ≥ 28	Ct ≥ 29	Ct ≥ 28	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 28	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Negativo o por debajo del LOD *.

* LOD: límite de detección

- a) Si cualquier valor FAM Ct de Tube ①~⑪ es < 26, la muestra se determina como positiva (mutación KRAS detectada).
 - b) Si cualquier valor FAM Ct de Tube ①~⑪ está en el rango de Ct aceptable, calcular el valor de ΔCt para cada mutación que muestre amplificación positiva.
 - i. **Valor de ΔCt = Valor Ct de FAM Mutante - Valor Ct de FAM Control Externo.**
 - ii. Si el valor de ΔCt es menor que el valor de ΔCt de corte correspondiente, la muestra se determina como positiva (mutación detectada).
 - iii. Si el valor de ΔCt es igual o mayor que el valor de ΔCt de corte correspondiente, la muestra se determina como negativa (sin mutación detectada) o por debajo del LOD del kit.
 - c) Si todos los valores FAM Ct de Tubes ①~⑪ están en el rango Ct negativo o no hay amplificación, la muestra se determina como negativa (No se detectó mutación) o por debajo del LOD del kit.
- 7) Puede producirse cierta reactividad cruzada entre las reacciones de mutación de KRAS. Si se detecta una mutación positiva fuerte, algunas de las otras reacciones de mutación también pueden dar una curva positiva. Si se detectan dos o más de las 19 mutaciones, la que tenga el valor de Ct más pequeño se determina como verdadera positiva. Compruebe el valor de ΔCt de otras mutaciones para determinar el resultado (véase la Tabla 7).
- a) Si el valor de ΔCt es menor que el valor de corte de reactividad cruzada, la curva positiva se determina como verdadera positiva. Una muestra puede detectarse con una o más mutaciones de KRAS.
 - b) Si el valor de ΔCt es mayor o igual que el valor de corte de reactividad cruzada, el resultado se determina como negativo.

Tabla 7 Valor de ΔCt de corte de reactividad cruzada

Tube No.	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑨	⑩
KRAS-M1	-	-	-	-	-	9.06	-	-	-
KRAS-M2	-	-	11.3	-	10.68	7.53	-	-	-
KRAS-M3	-	11.87	-	-	-	7.52	-	-	-
KRAS-M4	12.8	-	11.37	-	9.7	10.83	-	-	-
KRAS-M5	-	-	-	12.58	-	5.58	-	-	-
KRAS-M6	-	-	-	-	12.09	-	-	-	-
KRAS-M7	10.98	-	-	12.14	-	10.64	-	-	-
KRAS-M19	-	-	-	-	-	-	-	-	8.8
KRAS-M15	-	-	-	-	-	-	-	8.21	-

Note: "-" símbolo de no reactividad cruzada.

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

Características de Presentación

Las características de rendimiento de este kit se validaron en Stratagene Mx3000P™, ABI7500, LightCycler480, Bio-Rad CFX96, Rotor-Gene Q / 6000 (72 pocillos) y SLAN-96S.

1) Límite de detección:

- Para Stratagene Mx3000P™, 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.
- Para otros instrumentos de PCR, 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. Excepto: la sensibilidad de las mutaciones KRAS-M16 y KRAS-M18 es del 2% a una cantidad de muestra de ADN de 10 ng, la sensibilidad de las mutaciones de KRAS-M20, KRAS-M22 y KRAS-M23 es del 5% 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 precisión del kit se estableció probando 11 controles de referencia positivos. La prueba dio resultados positivos y la tasa de concordancia positiva fue del 100%.

4) Factor de interferencia:

En este estudio se evaluaron 4 sustancias de interferencia comunes: hemoglobina, triglicéridos, mycobacterium tuberculosis y neumonía por estreptococo que están fácilmente presentes en las muestras de FFPE. Se confirma que las concentraciones máximas potenciales: 2 mg / ml de hemoglobina, 37 mmol / L de triglicéridos, 10⁶ UFC / ml de mycobacterium tuberculosis y 10⁶ UFC / ml de neumonía por estreptococo no interferirían con el resultado de la prueba.

5) 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 10%.

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 de tejido tumoral FFPE.
- 4) CSe observó reactividad de Ross con la mutación KRAS G12F en KRAS¹⁹ Reaction Mix 6, que representa ~ 0,48% de los pacientes con cáncer de pulmón.
- 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 de KRAS.
- 7) Las muestras con resultado negativo (sin mutación detectada) pueden albergar mutaciones de KRAS no detectadas por este ensayo.

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

Referencias

- 1) FDA website: <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm172905.htm>.
- 2) McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV, Levinson AD, 1983. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 304 (5926): 501-6.
- 3) Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66 (8): 3992-5.
- 4) James RM, Arends MJ, Plowman SJ, et al. 2003. KRAS Proto-Oncogene exhibits tumor suppressor activity as its absence promotes tumorigenesis in Murine Teratomas. *Mol Cancer Res.* 1: 820-5.
- 5) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. 2013. Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 369 (11): 1023-34.
- 6) Roock WD, Jonker DJ, Nicolantonio FD, et al. 2010. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA*, 304(16): 1812-1820.

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 KRAS detectadas por el Kit

No. de Tubo	Reactivo	Exón	Mutación	Cambio de Base	Cosmic ID	Nombre
①	KRAS ^{G12D} Reaction Mix 1	2	G12D	35G>A	521	KRAS-M1
②	KRAS ^{G12A} Reaction Mix 2	2	G12A	35G>C	522	KRAS-M2
③	KRAS ^{G12V} Reaction Mix 3	2	G12V	35G>T	520	KRAS-M3
④	KRAS ^{G12S} Reaction Mix 4	2	G12S	34G>A	517	KRAS-M4
⑤	KRAS ^{G12R} Reaction Mix 5	2	G12R	34G>C	518	KRAS-M5
⑥	KRAS ^{G12C} Reaction Mix 6	2	G12C	34G>T	516	KRAS-M6
⑦	KRAS ^{G13D} Reaction Mix 7	2	G13D	38G>A	532	KRAS-M7
⑧	KRAS ^{G13C} Reaction Mix 8	2	G13C	37G>T	527	KRAS-M14
⑨	KRAS ^{A59T} Reaction Mix 9	3	A59T	175G>A	546	KRAS-M25
			Q61K	181C>A	549	KRAS-M19
			Q61L	182A>T	553	KRAS-M15
⑩	KRAS ^{G61R} Reaction Mix 10	3	Q61R	182A>G	552	KRAS-M16
			Q61H	183A>C	554	KRAS-M17
			Q61H	183A>T	555	KRAS-M18
			K117N	351A>C	19940	KRAS-M20
⑪	KRAS ^{K117N} Reaction Mix 11	4	K117N	351A>T	28519	KRAS-M21
			A146T	436G>A	19404	KRAS-M22
			A146V	437C>T	19900	KRAS-M23
			A146P	436G>C	19905	KRAS-M24

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

Se adjunta como archivo embebido el Proyecto de Disposición



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: Rótulos e Ifus EX-2021-56181588- -APN-DGA#ANMAT

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 1 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.05.09 11:42:35 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.05.09 11:42:37 -03:00