LeukoStrat®

Instrucciones de uso

CE IVD

Prueba de mutación de *FLT3* LeukoStrat®

Para la identificación de las mutaciones DIT y DTC en *FLT3*.

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*.

invivoscribe®

Condiciones de conservación: **de −85°C a −65°C**

Los controles de ADN pueden separarse de los kits de ensayo y conservarse a entre 2°C y 8°C.

N.º de catálogo		Productos	Cantidad
REF	94120010	LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay – Gel Detection	33 reacciones
REF	94120020	*FLT3* Mutation Assay MegaKit – Gel Detection	330 reacciones

Índice

1. USO PREVISTO 3

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA 3

2.1. Antecedentes 3
2.2. Descripción general 3

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO 3

3.1. Mutaciones por duplicación interna en tándem (DIT) de *FLT3* 3
3.2. Mutaciones del dominio tirosina cinasa (DTC) de *FLT3* 3
3.3. Detección en gel 4

4. REACTIVOS 5

4.1. Componentes del reactivo 5
4.2. Advertencias y precauciones 6
4.3. Conservación y manipulación 6

5. INSTRUMENTAL 7

5.1. Thermal cycler (termociclador) 7
5.2. Unidad de electroforesis 7
5.3. Unidad de iluminación UV 7

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS 8

6.1. Precauciones 8
6.2. Sustancias interferentes 8
6.3. Requisitos y manipulación de las muestras 8
6.4. Preparación de las muestras 8
6.5. Conservación de las muestras 8

7. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA 9

7.1. Materiales suministrados 9
7.2. Materiales necesarios (no suministrados) 9
7.3. Preparación de los reactivos 10
7.4. Amplificación 11
7.5. Digestión con enzimas de restricción solo para la Mezcla maestra para D835 de *FLT3* 11
7.6. Detección en gel – Gel de agarosa 12
7.7. Interpretación de los resultados Control de calidad 12

8. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 13

8.1. Análisis 13
8.2. Interpretación de las muestras 13

9. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO 14

10. VALORES PREVISTOS 14

10.1. Datos de referencia para la muestra 14
10.2. Datos de la muestra 14

11. EFICACIA DIAGNÓSTICA 15

12. SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE 15

13. BIBLIOGRAFÍA 16

14. SÍMBOLOS 16

15. AVISO LEGAL 16

15.1. Garantía y responsabilidad 16
15.2. Patentes y marcas registradas 16
15.3. Aviso para el comprador: SOLO para DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq 16

1. Uso previsto

El Ensayo de Mutación de *FLT3* LeukoStrat es un producto diagnóstico *in vitro* diseñado para la detección mediante PCR de mutaciones activadoras de *FLT3* en pacientes con leucemia mielógena aguda (LMA), y puede usarse para:

- Identificar duplicaciones internas en tándem (DIT) en el gen *FLT3*
- Identificar mutaciones del dominio tirosina cinasa (DTC) en el gen *FLT3*

2. Resumen y explicación de la prueba

2.1. Antecedentes

Por lo general, la leucemia mielógena aguda (LMA) tiene un mal pronóstico. La evaluación del estado de mutación del gen del receptor *FLT3* (tirosina cinasa 3 relacionada con fms) en la LMA con cariotipo normal es el indicador pronóstico más importante del desenlace de la enfermedad que, con frecuencia, es sustancial, ya que muchos estudios sobre LMA han mostrado que la presencia de mutaciones activadoras de *FLT3* augura un mal pronóstico.[1, 2] Por este motivo, el ensayo de mutación activadora de *FLT3* es necesario para estratificar la enfermedad y determinar las opciones de tratamiento apropiadas. Este ensayo mediante PCR LeukoStrat se dirige a las regiones del gen *FLT3* para identificar mutaciones por duplicación interna en tándem (DIT) y mutaciones del dominio tirosina cinasa (DTC), como la D835 e I836.

Este ensayo no puede detectar de manera fiable mutaciones en *FLT3* que comprendan menos del 5 % de la población total de células. **Los resultados de las pruebas de mutación molecular siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.**

2.2. Descripción general

Este kit de prueba incluye tres (3) mezclas maestras y dos (2) controles. La mezcla maestra *FLT3* ITD sirve para la detección de las mutaciones por duplicación interna en tándem la mezcla maestra *FLT3* D835 para la de las mutaciones en la región DTC. La mezcla de reacción Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño) se dirige a distintos genes para generar una serie de amplicones de aproximadamente 100, 200, 300, 400 y 600 pares de bases (pb) y garantizar que la calidad y la cantidad de ADN sean suficientes para que el resultado sea válido. Entre los componentes del kit se incluyen controles para las mutaciones DIT y DTC del gen *FLT3*.

3. Principios del procedimiento

3.1. Mutaciones por duplicación interna en tándem (DIT) de *FLT3*

La duplicación interna en tándem de FLT3 o las mutaciones de longitud están causadas por la duplicación e inserción de una parte del gen *FLT3* que incluye la región en y alrededor de la región yuxtamembrana (YM) del gen *FLT3*. Estas mutaciones varían en materia tanto de localización como de longitud de la secuencia de ADN duplicado insertada. Las mutaciones por DIT dan lugar a la autofosforilación y activación constitutivas de *FLT3*[1]. Cuando se utiliza un molde de ADNg humano en un analizador genético ABI 3500xL, los alelos silvestres de *FLT3* se amplificarán y darán lugar a un producto medido a 327±1 pb de acuerdo con este ensayo, mientras que los alelos que contengan mutaciones DIT darán lugar a un producto que supera las 327±1 pb (Figura 1).

3.2. Mutaciones del dominio tirosina cinasa (DTC) de *FLT3*

Las mutaciones del dominio tirosina cinasa (DTC) de *FLT3* están causadas por sustituciones en el ácido nucleico que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos en este centro catalítico altamente conservado. Las mutaciones del DTC, como D835 e I836, dan lugar a la autofosforilación y activación constitutivas de *FLT3*[2]. Los alelos silvestres del gen *FLT3* incluyen un sitio de digestión con la enzima de restricción EcoRV y cuando se produce una sustitución en el ácido nucleico, desaparece el sitio de reconocimiento para la digestión con la enzima de restricción y la endonucleasa EcoRV deja de poder identificar y digerir el ADN en dicho sitio. El Ensayo de Mutación de *FLT3* LeukoStrat utiliza cebadores que se encuentran en cada lado de la región DTC, en la que la región diana del *FLT3* se amplifica mediante PCR, seguida por la digestión con la enzima de restricción EcoRV. Como uno de los cebadores contiene un sitio de restricción para EcoRV, se digiere tanto el alelo silvestre como el mutado, creando un patrón de digestión que identifica la pérdida de la secuencia génica normal y garantiza la realización de la digestión. Cuando se utiliza un molde de ADNg humano en un analizador genético ABI 3500xL, los alelos silvestres del gen *FLT3* dan lugar a productos de digestión de 79±1 pb, mientras que los alelos mutantes dan lugar a productos de 124±1 pb o 127±1 pb a partir del producto del amplicón original sin digerir de 145±1 pb o 147±1 pb, de acuerdo con lo medido por este ensayo (Figura 1).

3.3. Detección en gel

La electroforesis en gel, como la electroforesis en gel de agarosa o la electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante (PAGE), se usa habitualmente para resolver los diferentes productos del amplicón en función de su tamaño, carga y conformación. Dado que el ADN está cargado negativamente, cuando se ejerce un potencial eléctrico (voltaje) a través del gel que contiene los productos de la PCR, el campo eléctrico hace que los amplicones se desplacen a través del gel. Los fragmentos de ADN más pequeños pueden desplazarse fácilmente a través de la matriz del gel, mientras que los fragmentos más grandes lo hacen más lentamente, lo que da lugar a la separación de los productos del amplicón en función del tamaño. A continuación, puede usarse ethidium bromide (bromuro de etidio) u otros colorantes por intercalación del ADN para teñir y detectar estos productos en el gel.

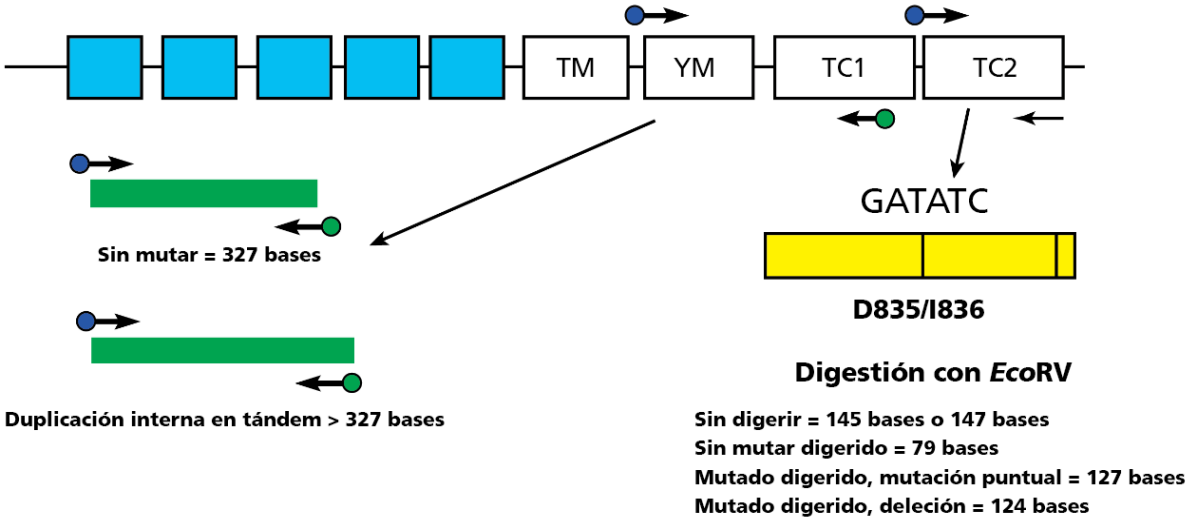

Figura 1. La figura representa la región yuxtamembrana (YM) de *FLT3* (TM = transmembrana) y el bucle de activación del dominio tirosina cinasa (TC). Las flechas negras representan las posiciones relativas de los cebadores que se dirigen a la región YM (en caso de DIT) o al bucle de activación del dominio cinasa (en caso de DTC). Los puntos coloreados representan los fluoróforos de los cebadores marcados. El cuadro amarillo contiene líneas verticales negras que representan la posición de las zonas de digestión con la enzima de restricción EcoRV. **Los tamaños de los productos reflejan el ADNg humano medido en un analizador genético ABI 3500xL.**

4. Reactivos

4.1. Componentes del reactivo

Tabla 1: Kits disponibles

Número de catálogo	Descripción	Cantidad
REF 94120010	Prueba de mutación de *FLT3* LeukoStrat – Detección en gel	33 reacciones
REF 94120020	Prueba de mutación de *FLT3* LeukoStrat MegaKit – Detección en gel	330 reacciones

Tabla 2: Componentes del kit

Reactivo	Número de catálogo (REF)	Componentes de los reactivos (principios activos)	Cantidad por unidad	94120010 Número de unidades	94120020 Número de unidades	Temp. de conservación
Mezclas de reacción	24120010CE	***FLT3* ITD Master Mix (Mezcla maestra: DIT para FLT3) – Sin marcar** Múltiples oligonucleótidos dirigidos al gen *FLT3* en una solución salina amortiguada.	1500 µL	1	10	-85°C a -65°C
	24120020CE	***FLT3* D835 Master Mix (Mezcla maestra: D835 para FLT3) – Sin marcar** Múltiples oligonucleótidos dirigidos a la región DTC de *FLT3* en una solución salina amortiguada.	1500 µL	1	10	
Mezcla de reacción de control de amplificación del molde	20960020	**Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (Control de la muestra con marcador de tamaño, sin marcar)** Distintos oligonucleótidos dirigidos a genes de mantenimiento.	1500 µL	1	10	
ADN de control positivo	40882960	**IVS-0010 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0010)** 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	2°C a 8°C o -85°C a -65°C
	40900180	**IVS-P004 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-P004)** 171 pg/mL de ADN plasmídico diluido en IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000) en solución TE 1/10.	100 µL	1	5	
ADN de control negativo (normal)	40920010	**IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000)** 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	2°C a 8°C o -85°C a -65°C

Nota: No se han utilizado conservantes en la fabricación de este kit.

4.2. Advertencias y precauciones

- IVD Este producto es para uso diagnóstico *in vitro*.
- Utilice este kit de prueba a modo de sistema. No utilice reactivos de otros fabricantes. Cualquier alteración del protocolo —como la realización de diluciones o reducciones de las reacciones de amplificación— puede afectar al rendimiento de la prueba e implicar la anulación de cualquier garantía derivada de la adquisición de estos kits.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada si se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- El cumplimiento del protocolo garantiza un rendimiento y una reproducibilidad óptimos. Asegúrese de usar el programa adecuado del termociclador, ya que, si usa otros programas, los resultados serán imprecisos o erróneos y darán lugar a falsos positivos y falsos negativos.
- No mezcle ni combine reactivos de kits con diferentes números de lote.
- Utilice equipos de protección individual estándar, siga las prácticas óptimas de laboratorio y tome las precauciones necesarias cuando trabaje con muestras. Manipule las muestras en instalaciones aprobadas de contención de seguridad biológica y ábralas solo en campanas de seguridad biológica certificadas. Emplee agua para uso en biología molecular a la hora de preparar el ADN de la muestra.
- Dado que se trata de una prueba de sensibilidad analítica, debe ser extremadamente cauteloso para evitar la contaminación de los reactivos o mezclas de amplificación con muestras, controles o material amplificado. Todos los reactivos deben controlarse estrechamente para detectar signos de contaminación (*p. ej.,* controles negativos que den señales positivas). Elimine cualquier reactivo que pueda haberse contaminado.
- Para reducir al mínimo la contaminación, use guantes limpios cuando manipule muestras y reactivos y limpie de manera regular las zonas de trabajo y las pipetas antes de realizar pruebas por PCR.
- El autoclave no elimina la contaminación del ADN. En el laboratorio de PCR, siga una secuencia de trabajo unidireccional entre las distintas zonas de trabajo: comience con la preparación de mezclas de reacción, continúe con la preparación de las muestras, luego con la amplificación y, finalmente, con la detección. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para la preparación de mezclas de reacción o de muestras.
- Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica del laboratorio deben ser de uso exclusivo de dicha zona.
- Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación con RNasa y DNasa o la contaminación cruzada.

4.3. Conservación y manipulación

- Si no va a hacer un uso inmediato de los kits de ensayo, **consérvelos a una temperatura de entre −85°C y −65°C**.
- La temperatura de conservación óptima para los controles de ADN es de entre 2°C y 8°C, pero los controles de ADN pueden conservarse a largo plazo entre −85°C y −65°C.
- Todos los reactivos y controles deben descongelarse y mezclarse en un agitador vortex o bien mezclarse exhaustivamente antes de usarse para garantizar su completa resuspensión. Una agitación vorticial excesiva puede dañar el ADN y hacer que los cebadores marcados pierdan sus fluoróforos.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de su fecha de caducidad.
- Debido a las altas concentraciones de sal, las mezclas de reacción de PCR son sensibles a los ciclos de congelación/descongelación. Vierta las mezclas de reacción en tubos estériles con cierre roscado y junta tórica si es necesario.

5. Instrumental

5.1. Thermal cycler (termociclador)

- Uso o función: amplificación de muestras de ADN.
- Eficacia diagnóstica y especificación:
  - Intervalo térmico mínimo: de 15°C a 96°C
  - Velocidad de aceleración mínima: 0,8°C/s
- Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante.
- Consulte el apartado *7.47.4,Amplificación*, para conocer el programa del termociclador.

5.2. Unidad de electroforesis

- Uso o función: separación de fragmentos de ADN.
- Eficacia diagnóstica y especificación:
  - Capacidad para funcionar a 35-135 V durante períodos prolongados.
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante

5.3. Unidad de iluminación UV

- Uso o función: detección de ADN.
- Eficacia diagnóstica y especificación:
  - Capacidad para emitir luz a una longitud de onda aproximada de 302 nm.
- Siga los procedimientos de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante.

6. Recogida y preparación de las muestras

6.1. Precauciones

Las muestras biológicas procedentes de seres humanos pueden contener materiales posiblemente infecciosos. Manipule las muestras de acuerdo con la norma de la OSHA sobre patógenos de transmisión hemática y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.

6.2. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias pueden interferir con la PCR:

- Quelantes de cationes divalentes.
- Puntas de pipeta de baja retención.
- EDTA (no significativo en concentraciones bajas).
- Heparina.

6.3. Requisitos y manipulación de las muestras

Este ensayo analiza el **ADN genómico** (ADNg) de los siguientes orígenes:

- 5 cc de sangre periférica, biopsia de médula ósea o aspirado de médula ósea anticoagulado con heparina o EDTA (conservados a entre 2°C y 8°C y enviados a temperatura ambiente)
- 5 mm cúbicos como mínimo de tejido (conservados y enviados congelados o conservados y enviados en RPMI 1640 a temperatura ambiente o en hielo)
- 2 µg de ADN genómico (conservados a entre 2°C y 8°C y transportados a temperatura ambiente)
- Tejido o cortes fijados en formol e incluidos en parafina (conservados y enviados a temperatura ambiente)

6.4. Preparación de las muestras

Extraiga el ADNg de las muestras de los pacientes lo antes posible. Vuelva a suspender el ADN en concentraciones finales de entre 100 µg y 400 µg por mL en solución TE 1/10 (1 mM de Tris-HCl, pH 8,0 y 0,1 mM de EDTA) o en agua para uso en biología molecular o que reúna las condiciones de la USP. Este es un sistema de pruebas sólido. Los resultados válidos derivan de un amplio abanico de concentraciones de ADN. Por lo tanto, no suele ser necesario cuantificar y ajustar las concentraciones de ADN. Analizar el ADN de la muestra con la Specimen Control Size Ladder garantizará que la calidad y la cantidad del ADN sean suficientes para que el resultado sea válido.

6.5. Conservación de las muestras

Conserve el ADNg de 2°C a 8°C o de –85°C a –65°C.

7. Procedimiento de la prueba

7.1. Materiales suministrados

Tabla 3: Componentes del kit

Número de catálogo	Descripción
REF 24120010CE	*FLT3* ITD Master Mix (Mezcla maestra: DIT para FLT3) – Sin marcar
REF 24120020CE	*FLT3* D835 Master Mix (Mezcla maestra: D835 para FLT3) – Sin marcar
REF 20960020	Specimen Control Size Ladder – Unlabeled (Control de la muestra con marcador de tamaño, sin marcar)
REF 40882960	IVS-0010 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-0010)
REF 40900180	IVS-P004 Clonal Control DNA (ADN de control clonal IVS-P004)
REF 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (ADN de control policlonal IVS-0000)

7.2. Materiales necesarios (no suministrados)

Tabla 4: Materiales necesarios (no suministrados)

Reactivo/material	Reactivos o material recomendado y proveedor	N.º de catálogo (REF)	Notas
ADN polimerasa	Roche: • DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq Invivoscribe, Inc.: • DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq[1] o equivalente	05206944190 60970100	N.P.
Endonucleasa EcoRV	New England BioLabs: • 20 000 unidades/mL de EcoRV	R0195L	N.P.
Solución amortiguadora para EcoRV	New England BioLabs: • 10X NEBuffer 3	B7003s	Suele ir incluida con la enzima de restricción EcoRV
Agua para uso en biología molecular o que reúna las condiciones de la USP	N.P.	N.P.	Estéril y exenta de DNasa y RNasa.
Pipetas calibradas	Rainin: • Pipetas P-2, P-20, P-200 y P-1000 • O pipetas SL-2, SL-20, SL-200 y SL-1000	N.P.	Deben ser capaces de medir con precisión volúmenes de entre 1 µl y 1000 µl.
Thermal cycler (termociclador)	Bio-Rad: • MJ Research PTC-100 o PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer: • PE 9600 o PE 9700	N.P.	N.P.
Agitador vortex	N.P.	N.P.	N.P.
Placas o tubos para PCR	N.P.	N.P.	Estériles
Puntas de pipeta con barrera de filtro	N.P.	N.P.	Estériles y exentas de RNasa, DNasa y pirógenos
Tubos de microcentrífuga	N.P.	N.P.	Estériles.
Unidad de electroforesis en gel	N.P.	N.P.	Para geles de poliacrilamida.
Ethidium Bromide (bromuro de etidio)	Thermo Fisher Scientific: • Ethidium Bromide (bromuro de etidio) UltraPure™ 10 mg/mL	15585-011	N.P.
Gel de agarosa	Thermo Fisher Scientific: • NuSieve® TM 3:1 agarose (agarosa)	50091	N. P.

Tabla 4: Materiales necesarios (no suministrados)

Reactivo/material	Reactivos o material recomendado y proveedor	N.º de catálogo (REF)	Notas
Amortiguador TBE de migración	Thermo Fisher Scientific: • Novex TBE Running Buffer (5X) (Amortiguador TBE de migración Novex [5X])	LC6675	Diluir en 1:5 antes de usar.
Amortiguador de carga de gel	Thermo Fisher Scientific: • 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Amortiguador de carga de gel 10X BlueJuice)	10816-015	N. P.
100 bp DNA Ladder (Marcador de ADN de 100 pb)	Thermo Fisher Scientific: • 100 bp DNA Ladder (marcador de ADN de 100 pb) TrackIt™	10488-058	N. P.

[1]**Nota:** Este producto está a la venta únicamente para su uso en el Espacio Económico Europeo. No debe revenderse ni transferirse a terceros. Consulte también el Aviso legal en el apartado 15.

7.3. Preparación de los reactivos

- Analice todas las muestras desconocidas usando la mezcla de reacción Specimen Control Size Ladder para garantizar la ausencia de inhibidores de la amplificación y la presencia de la cantidad y la calidad necesarias del ADN para generar un resultado válido.
- Los resultados de los análisis individuales son válidos; sin embargo, cuando sea posible, analice por **duplicado**. Si los análisis por duplicado arrojan resultados incoherentes, puede ser necesario realizar un nuevo análisis de la muestra.
- Analice los controles **positivos**, **negativos** y **blancos** de cada mezcla de reacción.

7.3.1. Póngase los guantes para sacar las mezclas de reacción del congelador. Deje que los tubos se descongelen. A continuación, mezcle con el agitador vorticial.

7.3.2. Encienda la campana de extracción o la cabina para PCR y pipetee una parte de cada mezcla de reacción a los tubos para microcentrífuga, que deberán estar esterilizados y limpios.

- Los volúmenes de las partes son de 45 µL para cada reacción.
- Añada una reacción adicional por cada 15 reacciones para corregir errores de pipeteo.
- Para cada mezcla de reacción (excepto para la Specimen Control Size Ladder), el número de reacciones (**n**) es:

n = 2 × n.º de muestras	(analice las muestras por duplicado)
+ 1	ADN de control positivo (consulte el apartado *7.7, Controles positivos recomendados*)
+ 1	ADN de control negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	control sin molde (agua)
+ 1	para corregir errores de pipeteo
n = 2 × n.º de muestras + 4	**Total**

- Por lo tanto, el volumen total de la parte para cada mezcla de reacción es n × 45 µL.
- Para Specimen Control Size Ladder Master Mix, el número de reacciones (**m**) es:

m = núm. de muestras	(analice cada muestra una sola vez)
+ 1	ADN de control positivo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	control sin molde (agua)
+ 1	para corregir errores de pipeteo
m = n.º de muestras + 3	**Total**

- Por lo tanto, el volumen total de la parte de Specimen Control Size Ladder Master Mix es **m × 45 µL**.

7.3.3. Añada 1,25 unidades (o 0,25 µL a 5 U/µL) de ADN Taq polimerasa por reacción a cada mezcla de reacción.

- La ADN polimerasa total pipeteada a cada mezcla de reacción es **n × 0,25 µL** y **m × 0,25 µL** para la Specimen Control Size Ladder Master Mix.
- Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

7.3.4. Por cada reacción, vierta 45 µL de la mezcla de reacción que corresponda + la solución de ADN polimerasa en los pocillos de una placa o un tubo para PCR.

7.3.5. Añada 5 µL del molde que corresponda (ADN de muestra, ADN de control positivo, ADN de control negativo o agua) a los pocillos individuales que contengan las mezclas de reacción respectivas.

- Pipetee arriba y abajo varias veces para mezclar.

7.3.6. Tape o cubra la placa para PCR.

- Las muestras estarán listas para su amplificación en un termociclador.
- Si la amplificación no puede realizarse inmediatamente después de preparar el reactivo, las placas o tubos para PCR pueden conservarse a entre 2°C y 8°C durante 24 horas como máximo.

Guía rápida:

Por cada mezcla de reacción y **n** de reacciones, mezcle:

n × 45 µL Mezcla de reacción

n × 0,25 µL ADN polimerasa Taq

Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

Pipetee **45 µL** de la mezcla de reacción + la solución de ADN polimerasa en cada pocillo de reacción

Pipetee **5 µL** del molde que corresponda en cada pocillo.

Volumen total de la reacción = **50 µL**

7.4. Amplificación

7.4.1. Amplifique las muestras mediante el siguiente programa de PCR:

- Seleccione la opción de medición de la temperatura **indicada** en los termocicladores BioRad MJ Research PTC.

Tabla 5: Condiciones del termociclador

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
1	95°C	7 minutos	1
2	94°C	30 segundos	35
3	55°C	30 segundos	
4	72°C	60 segundos	
5	72°C	10 minutos	1
6	15°C	∞	1

7.4.2. Extraiga la placa o los tubos de amplificación del termociclador.

- Aunque el ADN amplificado sea estable a temperatura ambiente durante largos períodos, conserve los productos de la PCR a entre 2°C y 8°C hasta la detección.
- La detección debe realizarse en los 30 días posteriores a la amplificación.

7.5. Digestión con enzimas de restricción solo para la Mezcla maestra para D835 de *FLT3*

7.5.1. Con los guantes puestos, retire el NEBuffer 3 del congelador. Deje que se descongele completamente; luego agite suavemente para mezclar.

7.5.2. En la campana de contención o en la caja de aire muerto, agregue lo siguiente a un tubo de microcentrífuga limpio y estéril individual.

- Añada una reacción adicional por cada 15 reacciones para corregir errores de pipeteo.
- Por tanto, el número de reacciones (**n**) debe ser:

n = 2 × núm. de muestras + 1	(analice las muestras por duplicado) para corregir errores de pipeteo
n = 2 × n.º de muestras + 1	**Total**

7.5.3. Añada 16 µL de agua de grado molecular por reacción a cada tubo.

- El total de agua añadida es **n × 16 µL**.

7.5.4. Añada 2 µL de 10X NEBuffer3 por reacción a cada tubo.

- La cantidad total de 10X NEBuffer3 añadida es **n × 2 µL**.

7.5.5. Añada 40 unidades (o 2 µL a 20 000 U/mL) de endonucleasa EcoRV por reacción a cada tubo.

- La cantidad total endonucleasa EcoRV añadida es **n × 2 µL**.
- Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

7.5.6. Para cada reacción, alicuote 20 µL de la solución anterior en los pocillos individuales en una placa o tubo de PCR.

7.5.7. Añada 10 µL de cada muestra/control amplificado con la mezcla maestra *FLT3* D835 a los pocillos individuales que contienen la solución anterior.

- Pipetee arriba y abajo varias veces para mezclar.

7.5.8. Tape o cubra la placa para PCR.

7.5.9. Incube a 37°C durante al menos 60 minutos y hasta 24 horas.

- Aunque el ADN amplificado sea estable a temperatura ambiente durante largos períodos, conserve los productos de la PCR a entre 2°C y 8°C hasta la detección.
- La detección debe realizarse en los 30 días posteriores a la amplificación.

7.6. Detección en gel – Gel de agarosa

7.6.1. Monte la unidad de electroforesis usando un gel TBE de agarosa NuSieve 3:1 al 2 % que contenga 0,4 µg/mL de bromuro de etidio y un amortiguador de migración TBE 1X.

7.6.2. Mezcle 20 µL de cada muestra con 4 µL de tampón de carga 6X.

7.6.3. Cargue 20 µL de la mezcla en pocillos individuales del gel.

7.6.4. Procese a 100 V durante 55 minutos.

7.6.5. Coloque el gel sobre el iluminador UV para ver las bandas.

7.6.6. Fotografíe e interprete los datos resultantes. (Consulte los apartados 8: *Interpretación de resultados* y 10: *Valores previstos*)

7.7. Interpretación de los resultados Control de calidad

Con el kit se suministran controles positivos y negativos (o normales); estos pueden desarrollarse una sola vez cada vez que se realiza la prueba, a fin de garantizar la realización adecuada. También debe desarrollarse un control sin molde (*p. ej*., agua) para saber si la mezcla maestra se ha contaminado y si existe contaminación cruzada en las reacciones. Por otro lado, debe incluirse un control de la solución amortiguadora para garantizar que la solución amortiguadora no esté contaminada. Los valores de los controles positivos figuran en el apartado 10.1: *Datos de referencia para la muestra*.

Tabla 6: Tamaños de los productos determinados usando las mezclas maestras/controles que vienen en el kit de detección mediante electroforesis capilar en una plataforma ABI 3100. Es previsible que haya una diferencia intrainstrumental de 1-4 pares de bases.

Mezcla de reacción	Diana	ADN de control	Número de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
***FLT3* ITD Master Mix**	DIT	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0010 Clonal Control DNA	--- 40882960	**330 - 1000** 360
***FLT3* ITD Master Mix**	DTC	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-P004 Clonal Control DNA	--- 40900180	**150 - sin digerir** 150 - sin digerir 129 - digerido
Specimen Control Size Ladder	Distintos genes	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**100, 200, 300, 400, 600[a]** 100, 200, 300, 400, 600[a]

[a]**Nota**: Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.

8. Interpretación de los resultados

Tanto los resultados positivos como negativos se deben interpretar en el contexto de toda la información clínica y de los resultados de los análisis de laboratorio. El intervalo de tamaños de cada mezcla de reacción se ha determinado mediante el análisis de las muestras de control positivo y negativo. Para que la interpretación sea precisa y significativa, descarte las bandas que no se ajusten al intervalo de tamaños válidos para cada una de las mezclas de reacción.

8.1. Análisis

8.1.1. Indique lo siguiente para las muestras que no consiga amplificar tras repetir el análisis: **"Se desconoce la naturaleza de la muestra porque la cantidad o la calidad del ADN eran insuficientes para su análisis"**.

8.1.2. Repita el análisis de las muestras que den negativo si falló la reacción del control positivo.

8.1.3. Si las muestras desarrolladas por duplicado arrojan resultados incompatibles, realice un nuevo análisis o una nueva evaluación de las muestras.

8.1.4. Deben examinarse todos los controles antes de interpretar los resultados de las muestras. Si los controles no arrojan resultados correctos, la prueba no es válida, por lo que no pueden interpretarse las muestras.

Tabla 7. A continuación se describe el análisis de cada uno de los controles, así como las decisiones que deben tomarse en función de los resultados.

Tipo de control	Resultado previsto	Resultado anómalo
Control sin molde	Ausencia de amplificación: continúe con el análisis.	Presencia de amplificación: repita la prueba.
Control policlonal	El tamaño del producto se ajusta al tamaño previsto en el apartado 10: *Valores previstos* . Continúe con el análisis.	Aparecen bandas positivas recogidas en el apartado 10.1: *Datos de referencia para la muestra*. Repita la prueba.
Control positivo (puede usarse un control de la extracción si el material de referencia positivo abarca procesos de extracción)	El tamaño del producto se ajusta al tamaño previsto en el apartado 10: *Valores previstos* . Continúe con el análisis.	Repita la prueba.
Specimen Control Size Ladder (este control de amplificación es esencial para muestras cuya cantidad y calidad se desconoce)	Si se observan picos de 100, 200, 300, 400 y 600 pb, continúe con el análisis. Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb tenga una menor señal o que esté completamente ausente. Continúe con el análisis.	Si no se observan bandas, repita la prueba, a menos que la muestra arroje un resultado positivo. Si solo se observan 1, 2 o 3 bandas, vuelva a evaluar la muestra para comprobar la presencia de degradación del ADN, a menos que la muestra arroje un resultado positivo.

8.2. Interpretación de las muestras

Si los controles arrojan los resultados previstos, interprete las muestras clínicas del siguiente modo:

8.2.1. Mezcla maestra para DIT de *FLT3*

- **Positivo:** La presencia de una o varias bandas mayores de 335 bp se notifica como: "**Detección de una mutación DIT del gen *FLT3*".**
- **Negativo:** La presencia de una banda a ~330 bp sin bandas mayores de 335 bp se notifica como: "**No hay pruebas de la existencia de una mutación DIT del gen *FLT3*".**

8.2.2. Mezcla maestra para D835 de *FLT3*

- **Positivo:** La presencia de una banda a ~150 bp (sin digerir) y ~130 bp, sin banda a ~150 bp (digerido por EcoRV), se notifica como: "**Detección de una mutación DTC del gen *FLT3*".**
- **Negativo:** La presencia de una banda a ~150 bp (sin digerir) y ~81 bp (digerido por EcoRV), sin banda a ~130 bp ni ~150 bp (digerido por EcoRV), se notifica como: "**No hay pruebas de la existencia de una mutación DTC del gen *FLT3*".**

9. Limitaciones del procedimiento

- Este ensayo no identifica el 100 % de las mutaciones activadoras de *FLT3*.
- La prueba no detecta de manera fiable menos de cinco (5) células positivas por cada 100 células normales.
- Los resultados de las pruebas moleculares siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.
- Las pruebas por PCR están sujetas a interferencia por degradación del ADN o inhibición de la PCR por EDTA, heparina y otros compuestos.

10. Valores previstos

10.1. Datos de referencia para la muestra

Tabla 8: Como referencia, los tamaños de los productos se determinaron usando las mezclas maestras/controles que vienen en el kit con detección mediante electroforesis capilar en una plataforma ABI 3100. Es previsible que haya una diferencia intrainstrumental de 1-4 pares de bases.

Mezcla de reacción	Diana	ADN de control	Número de catálogo	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
***FLT3* ITD Master Mix**	DIT	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0010 Clonal Control DNA	--- 40920010 40882960	**330 - 1000** 330 360
***FLT3* ITD Master Mix**	DTC	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-P004 Clonal Control DNA	--- 40920010 40900180	**150 - sin digerir** 150 - sin digerir 80 - digerido 150 - sin digerir 129 - digerido
Specimen Control Size Ladder	Distintos genes	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**100, 200, 300, 400, 600[a]** 100, 200, 300, 400, 600[a]

[a]**Nota:** Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.

10.2. Datos de la muestra

Los datos que se muestran abajo se generaron usando las mezclas maestras y los controles indicados para analizar los productos amplificados en un gel de agarosa al 2 %.

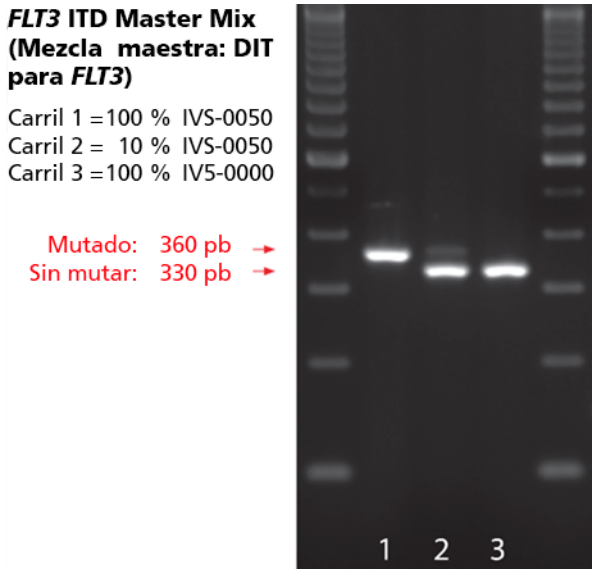

Figura 2. *FLT3* ITD Master Mix..

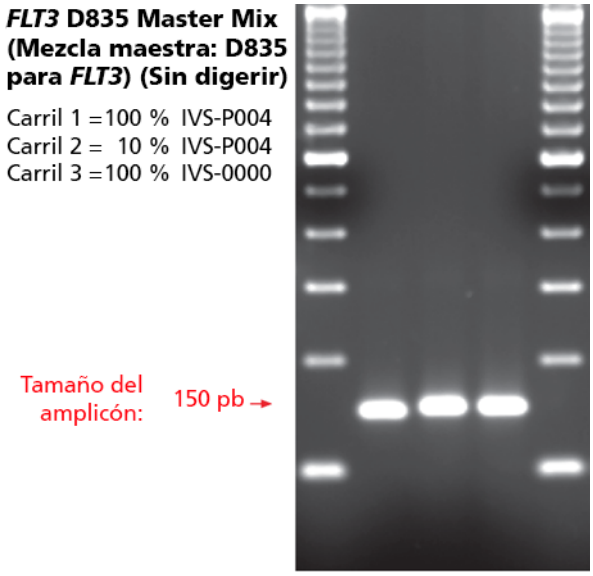

Figura 3. *FLT3* D835 Master Mix (Sin digerir).

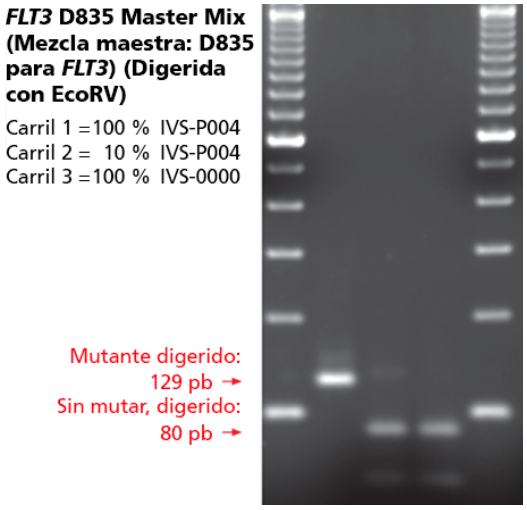

Figura 4. *FLT3* D835 Master Mix (Digerida con EcoRV).

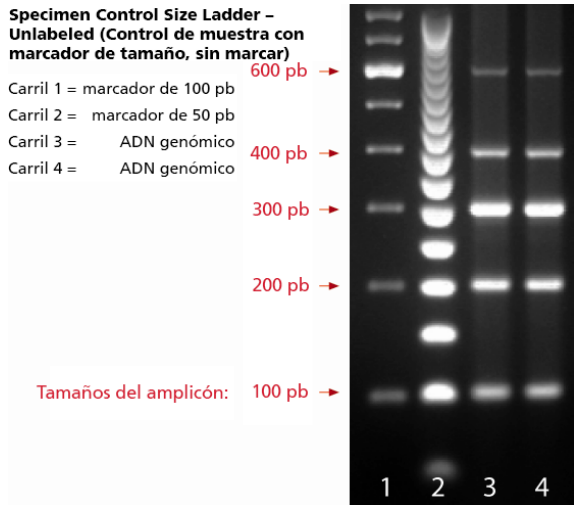

Figura 5. Mezcla de reacción Specimen Control Size Ladder.

11. Eficacia diagnóstica

Esta prueba de mutación de *FLT3* LeukoStrat es un procedimiento rápido y fiable para la detección de mutaciones en el gen *FLT3*. Prueba de ello es la evaluación realizada por el Laboratory for Personalized Molecular Medicine (LabPMM).

Tabla 9. Resultados de los estudios de concordancia

Diana	Concordancia con tres laboratorios independientes:
DIT	Sensibilidad del 100 % y especificidad del 100 %
DTC	Sensibilidad del 100 % y especificidad del 100 %

LabPMM analizó 57 muestras de pacientes ciegas obtenidas de tres instituciones independientes. Trece de ellas se habían determinado como positivas para la mutación DIT del gen *FLT3* y 33 como negativas para la mutación DIT del gen *FLT3* en las instituciones independientes. Seis de ellas se habían determinado como positivas para la mutación DTC del gen *FLT3* y 50 como negativas para la mutación DTC del gen *FLT3* en las instituciones que habían suministrado las muestras. Además, para la validación de la mutación DTC del gen *FLT3*, se usaron 10 muestras positivas inoculadas y 10 muestras negativas. La prueba de mutación de *FLT3* LeukoStrat presentó una sensibilidad y una especificidad del 100 % con ambas mezclas maestras. Se determinó que la sensibilidad analítica de las dos mezclas maestras era de 5 células positivas en un total de 100 células.

12. Servicio técnico y atención al cliente

Los representantes del servicio técnico y de atención al cliente están disponibles de lunes a viernes para responder a sus preguntas por teléfono, correo electrónico o web.

Datos de contacto

Invivoscribe, Inc.
10222 Barnes Canyon Road, Bldg. 1
San Diego, California 92121-2711
Estados Unidos

Teléfono:	+1 858 224-6600
Fax:	+1 858 224-6601
Servicio técnico:	support@invivoscribe.com
Atención al cliente:	sales@invivoscribe.com
Sitio web:	www.invivoscribe.com
Horario comercial:	De 07:00 a 17:00 PST/PDT

Representante autorizado y asistencia técnica en la UE

EC REP Invivoscribe, SARL
Le Forum – Bât B
515 Avenue de la Tramontane
ZI Athélia IV
13600 La Ciotat, Francia

Teléfono:	+33 (0)4 42 01 78 10
Fax:	+33 (0)4 88 56 22 89
Servicio técnico:	support@invivoscribe.com
Atención al cliente:	sales-eu@invivoscribe.com
Sitio web:	www.invivoscribe.com
Horario comercial:	De 09:00 a 17:00 CET/CEST

13. Bibliografía

1. Murphy KM, Smith BD, Levis M, Small D and Berg KD. A Clinical PCR/Capillary Electrophoresis Assay for the Detection of Internal Tandem Duplication and Point Mutation of the *FLT3* Gene. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2003, **5:**96-102.
2. Yamamoto, Y., *et al.,* Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001, **97**(8):2434-9.

14. Símbolos

Los siguientes símbolos figuran en el etiquetado de los productos de Invivoscribe:

IVD	Para uso diagnóstico *in vitro*		Fecha de caducidad
REF	Número de catálogo	EC REP	Representante autorizado en la Comunidad Europea
VOL	Volumen de reactivo		Consulte las instrucciones de uso
LOT	Número de lote		Condiciones de conservación

15. Aviso legal

15.1. Garantía y responsabilidad

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) se compromete a suministrar productos de primera calidad. Invivoscribe® garantiza que sus productos cumplen e incluso superan los criterios de rendimiento descritos en las Instrucciones de uso por lo que respecta a los productos cubiertos. Si alguno de los productos no funciona de acuerdo con las especificaciones indicadas para el producto en cuestión, nuestra política es reemplazar el producto o abonar el precio total de compra. Invivoscribe® no ofrece ninguna otra garantía, explícita o implícita. La responsabilidad de Invivoscribe® se limita al precio de compra del producto. Invivoscribe no se responsabilizará de daños directos, indirectos, consecuentes o accidentales derivados del uso, los resultados del uso o la imposibilidad de usar sus productos. Debe establecerse y controlarse continuamente la eficacia del producto en condiciones controladas por el comprador y en su laboratorio a través de procesos definidos y controlados por el comprador, entre los que se incluyen las pruebas con controles positivos, negativos y sin molde cada vez que se analiza una muestra. El pedido, la aceptación y el uso del producto constituyen la aceptación por parte del comprador de la responsabilidad exclusiva de garantizar la eficacia del producto y el acuerdo del comprador con la limitación de responsabilidad.

Este es un producto de diagnóstico in vitro que no está disponible para su venta o uso en Norteamérica.

15.2. Patentes y marcas registradas

Muchos de estos productos implican el uso de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante la compra de este producto no se transmite de manera explícita ni implícita ninguna de las licencias de uso de estas patentes sobre enzimas o procesos de amplificación.

LeukoStrat® es una marca comercial registrada de Invivoscribe®.

©2021 Invivoscribe, Inc. Todos los derechos reservados. Las marcas comerciales que figuran en este documento son propiedad de Invivoscribe, Inc., de sus filiales o, en el caso de las marcas comerciales de terceros, de sus respectivos propietarios.

15.3. Aviso para el comprador: SOLO para DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq

Este producto está a la venta únicamente para su uso en investigación en el Espacio Económico Europeo (EEE). No debe revenderse ni transferirse a terceros. El uso de este producto está cubierto por la patente estadounidense número 6 127 155 y las solicitudes de patentes pertinentes de fuera de los Estados Unidos. El comprador del producto puede usar únicamente la cantidad de producto necesaria para realizar investigaciones de carácter interno. No se otorgan de forma explícita derechos relacionados con otras solicitudes de patente ni derechos a prestar servicios comerciales de ningún tipo, entre los que se incluyen la notificación de resultados de las actividades del comprador a cambio de honorarios u otra consideración comercial. Este producto es solo para uso en investigación. De acuerdo con Roche, los usos para el diagnóstico en humanos y animales requieren una licencia específica de Roche. Todos los usos distintos de las investigaciones de carácter interno y los usos para diagnóstico en humanos y animales relacionados con la patente de Roche requieren una licencia específica de Thermo Fisher Scientific. Al usar este producto, reconoce su aceptación de lo anterior. Para saber más sobre la compra de licencias de Roche, póngase en contacto con el Departamento de Licencias de Roche Molecular Systems, Inc., 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, California 94588 (Estados Unidos) o con Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (Alemania). Para saber más sobre la compra de licencias de Thermo Fisher Scientific, póngase en contacto con el Departamento de Licencias de Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008 (Estados Unidos).