

Instructions d'utilisation



LeukoStrat[®] *FLT3* Mutation Assay 2.0

Destiné à l'identification des mutations à duplication interne en tandem (internal tandem duplication, ITD) et du domaine tyrosine kinase (tyrosine kinase domain, TKD) dans le gène « fms-related tyrosine kinase 3 (*FLT3*) ».

IVD Destiné au diagnostic *in vitro*



Conditions de conservation : -85 °C à -65 °C

(Les ADN contrôles peuvent être séparés des kits de test et conservés entre 2 °C et 8 °C.)

N° de référence
94120091

Produits
LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection

Quantité
33 réactions

Table des matières

1.	UTILISATION PRÉVUE	3
2.	RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST.....	3
2.1.	Contexte	3
2.2.	Sommaire	3
3.	PRINCIPES DE LA PROCÉDURE	3
3.1.	Mutations à duplication interne en tandem (ITD) de <i>FLT3</i>	3
3.2.	Mutations du domaine tyrosine kinase (TKD) de <i>FLT3</i>	3
3.3.	Détection par fluorescence différentielle.....	4
4.	RÉACTIFS.....	5
4.1.	Composants	5
4.2.	Avertissements et précautions	6
4.3.	Conservation et manipulation.....	6
5.	INSTRUMENTS	7
5.1.	Thermocycleur	7
5.2.	ABI 3130/3130xl ou 3500/3500xL	7
6.	PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	8
6.1.	Précautions	8
6.2.	Substances interférentes	8
6.3.	Conditions de prélèvement et manipulation	8
6.4.	Préparation de l'échantillon.....	8
6.5.	Conservation des échantillons	8
7.	PROCÉDURE DE TEST	9
7.1.	Matériel fourni.....	9
7.2.	Matériel nécessaire mais non fourni	9
7.3.	Préparation des réactifs	10
7.4.	Amplification	11
7.5.	Digestion par enzyme de restriction pour le mélange mère (master mix) <i>FLT3D835</i> uniquement.....	11
7.6.	Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI.....	12
7.7.	Contrôle qualité	12
8.	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	12
8.1.	Analyse.....	13
8.2.	Interprétation de l'échantillon	13
9.	LIMITES DE LA PROCÉDURE.....	14
10.	TAILLE ATTENDUE DES PRODUITS AMPLIFIÉS	14
10.1.	Taille attendue des produits amplifiés	14
10.2.	Données de l'échantillon	15
11.	CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	15
11.1.	Résumé des données.....	15
11.2.	Analyse des données	16
11.3.	Conclusion.....	17
12.	BIBLIOGRAPHIE	17
13.	SERVICE TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT.....	17
14.	SYMBOLES.....	18
15.	INFORMATIONS LÉGALES.....	18
15.1.	Garantie et responsabilité	18
15.2.	Brevets et Marques.....	18

1. Utilisation prévue

Le test de mutation LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à la détection des mutations activatrices du gène *FLT3* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM).

Le test *FLT3* Mutation Assay 2.0 peut notamment être utilisé pour :

- Identifier les mutations à duplication interne en tandem (ITD) dans le gène *FLT3*.
- Identifier les mutations du domaine tyrosine kinase (TKD) dans le gène *FLT3*.

2. Résumé et explication du test

2.1. Contexte

Généralement, le pronostic de la leucémie aiguë myéloïde (LAM) est défavorable. L'évaluation du statut mutationnel du gène du récepteur *FLT3* (fms-related tyrosine kinase 3) dans la LAM à caryotype normal est l'indicateur pronostique le plus important relatif à l'issue de la maladie, qui est parfois considérable, puisque de nombreuses études sur la LAM ont montré que la présence de mutations activatrices de *FLT3* laisse présager un mauvais pronostic.^{1,2} C'est pourquoi l'analyse de la mutation activatrice de *FLT3* est nécessaire pour déterminer le stade de la maladie et les options de traitement appropriées. Ce test LeukoStrat PCR cible les régions du gène *FLT3* afin d'identifier les mutations à duplication interne en tandem (ITD) et les mutations du domaine tyrosine kinase (TKD, telles que D835 et I836).

2.2. Sommaire

Ce test ne peut pas détecter de manière fiable les mutations *FLT3* représentant moins de 5 % de la population totale. Il convient de souligner que les résultats des tests de mutation moléculaire doivent toujours être interprétés dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.

Ce kit d'analyse contient 2 mélanges mères (master mixes) principaux : le mélange mère *FLT3* ITD Master Mix destiné à la détection des mutations à duplication interne en tandem et le mélange mère *FLT3* D835 Master Mix destiné à la détection des mutations du domaine tyrosine kinase (telles que les mutations D835 et I836).

3. Principes de la procédure

3.1. Mutations à duplication interne en tandem (ITD) de *FLT3*

Les mutations à duplication interne en tandem de *FLT3* ou les mutations de longueur sont dues à la duplication et à l'insertion d'une portion du gène *FLT3* qui inclut la région au sein et adjacente à la région juxta-membranaire du gène *FLT3*. Ces mutations varient selon le lieu et la longueur de la séquence d'ADN dupliquée insérée. Les mutations ITD entraînent une autophosphorylation constitutive et une activation de *FLT3*¹. Les allèles sauvages *FLT3* amplifieront et donneront un produit de 327±1 paires de bases (pb) comme mesuré par ce test, tandis que les allèles contenant les mutations ITD donneront un produit de ≥ 330 pb.

3.2. Mutations du domaine tyrosine kinase (TKD) de *FLT3*

Les mutations du domaine tyrosine kinase *FLT3* sont dues à des substitutions d'acide nucléique qui entraînent une altération de la séquence d'acides aminés dans ce centre catalytique bien conservé. Les mutations TKD telles que D835 et I836 entraînent une autophosphorylation constitutive et une activation de *FLT3*². Les allèles sauvages du gène *FLT3* incluent un site de digestion de l'enzyme de restriction EcoRV. Lorsqu'une substitution d'acides nucléiques survient, le site de reconnaissance de digestion de l'enzyme de restriction disparaît et l'endonucléase EcoRV est incapable d'identifier et de digérer l'ADN à ce site. Nos tests utilisent des amorces qui se trouvent de part et d'autre de la région TKD. La région cible *FLT3* est amplifiée à l'aide de la PCR, puis une digestion par l'enzyme de restriction EcoRV est effectuée. L'une des amorces PCR contient un site de l'enzyme de restriction EcoRV, ainsi les allèles sauvages comme les mutants sont digérés. Le schéma de digestion identifie la perte de la séquence normale du gène et confirme que la digestion a eu lieu. Les allèles sauvages du gène *FLT3* génèrent des produits de 79 pb et les allèles mutants des produits de 124 pb ou 127 pb. Les amplicons non digérés ont 147 pb (les tailles de produit correspondent aux résultats obtenus avec l'étalon GeneScan™ - 600™ LIZ Size Standard v2.0 et l'instrument ABI3500xL. L'utilisation d'étalons de taille différente et d'instruments différents pourrait produire des tailles de produit différentes).

3.3. Détection par fluorescence différentielle

La détection par fluorescence différentielle est couramment employée pour séparer les produits d'amplification de différentes tailles avec un instrument à électrophorèse capillaire. Les amorces peuvent être conjuguées avec plusieurs marqueurs fluorescents (fluorophores) qui peuvent produire différents spectres d'émission sous l'excitation d'un laser présent dans l'instrument à électrophorèse capillaire. Différents marqueurs fluorescents peuvent ainsi correspondre à différentes régions ciblées. Cette méthode de détection apporte une sensibilité élevée, une résolution au nucléotide près, une détection différentielle du produit et une quantification relative. En outre, l'utilisation d'agarose et de gels de polyacrylamide, ainsi que l'utilisation d'oncogènes tels que le bromure d'éthidium, peuvent pratiquement être éliminées. Enfin, la détection différentielle permet une interprétation précise, reproductible et objective des produits spécifiques aux amorces ainsi que l'archivage automatique des données. La reproductibilité inter-analyse et intra-analyse dans la détermination de la taille par électrophorèse capillaire est d'environ 1 à 2 nucléotides. Cette reproductibilité et cette sensibilité couplées à l'archivage automatique des données de l'échantillon permettent le suivi, la traçabilité et la comparaison des données du patient au fil du temps.

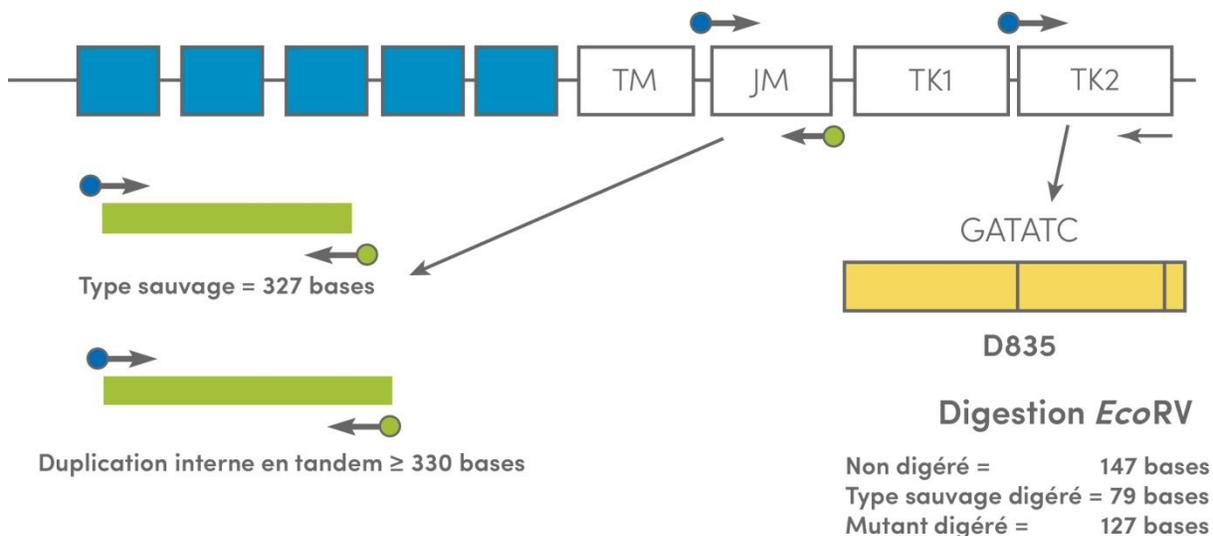


Figure 1. Illustration de la région JM *FLT3* et de la boucle d'activation du domaine kinase. Les points verts et bleus accompagnant les flèches noires représentent les positions relatives des amorces ciblant la région JM pour les mutations ITD et les autres points bleus et flèches noires représentent les positions relatives des amorces ciblant les mutations TKD dans la boucle d'activation du domaine kinase. Le rectangle jaune possède deux lignes noires verticales qui représentent la position des sites de digestion de l'enzyme de restriction *EcoRV* de type sauvage.

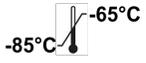
4. Réactifs

4.1. Composants

Tableau 1. Kits disponibles

N° de référence	Description	Nombre total de réactions
REF 94120091	LeukoStrat <i>FLT3</i> Mutation Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection	33 Reactions

Tableau 2. Composition du kit LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0

Réactif	N° de référence	Composants (substances actives)	Quantité unitaire	Nb d'unités	Temp. de conservation
Master Mix	REF 24120011CE	<i>FLT3</i> ITD Master Mix – 6FAM & HEX Oligonucléotides multiples ciblant le gène <i>FLT3</i> en solution saline tamponnée.	1500 µl	1	
	REF 24120031CE	<i>FLT3</i> D835 Master Mix – 6FAM Oligonucléotides multiples ciblant la région TDK du gène <i>FLT3</i> en solution saline tamponnée.	1500 µl	1	
Positive Control DNAs	REF 40883390	<i>FLT3</i> ITD Positive Control 50 µg/ml d'ADN dans une solution TE à 1/10 ^e	100 µl	1	 or 
	REF 40883400	<i>FLT3</i> D835 Positive Control 50 µg/ml d'ADN plasmidique dans une solution TE à 1/10 ^e	100 µl	1	
Negative (Normal) Control DNA	REF 40920030	<i>FLT3</i> Negative Control 50 µg/ml d'ADN dans une solution TE à 1/10 ^e	100 µl	1	

4.2. Avertissements et précautions

IMPORTANT ! Veuillez lire attentivement les instructions d'utilisation avant de débiter la procédure de test et suivre attentivement chaque étape.

- **IVD** Ce produit est destiné au diagnostic *in vitro*.
- Le kit d'analyse forme un système qui doit être utilisé tel quel. Ne pas remplacer les réactifs par ceux d'un autre fabricant. Une dilution, une réduction des volumes des réactions d'amplification ou tout autre écart par rapport à ce protocole peut affecter la performance de ce test et/ou annuler toute sous-licence limitée accordée avec l'achat de ce kit.
- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- Le strict respect du protocole garantit une performance optimale et une bonne reproductibilité. Il convient de veiller à utiliser le programme de thermocycleur adéquat, les autres programmes pouvant donner des résultats imprécis/faussés, comme des faux positifs et des faux négatifs.
- Utiliser uniquement EcoRV pour la digestion par enzyme de restriction ; l'utilisation d'une enzyme de restriction incorrecte peut donner des résultats faux positifs ou négatifs.
- Ne pas mélanger ou combiner les réactifs de kits comportant des numéros de lots différents.
- Toutes les procédures de laboratoire doivent être réalisées avec un équipement de protection individuelle standard (gants, blouse et lunettes de protection). Le personnel de laboratoire doit suivre les bonnes pratiques de laboratoire et les précautions universelles lors de la manipulation des échantillons. Les échantillons doivent être manipulés dans des installations de confinement de sécurité biologique approuvées, et les récipients doivent être ouverts uniquement dans une enceinte de sécurité biologique certifiée.
- Il est recommandé d'utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire dans la préparation de l'échantillon d'ADN.
- En raison de la sensibilité analytique de ce test, il convient de prendre de très grandes précautions pour éviter la contamination des réactifs ou des mélanges d'amplification avec des échantillons, des contrôles ou des matériels amplifiés. Tous les réactifs doivent être surveillés attentivement pour détecter tout signe de contamination (p. ex., contrôles négatifs donnant des signaux positifs). Jeter les réactifs suspectés d'être contaminés.
- Afin de minimiser la contamination, porter des gants propres lors de la manipulation des échantillons et des réactifs et nettoyer fréquemment les plans de travail et les pipettes avant de réaliser la PCR.
- La progression du travail dans le laboratoire réalisant la PCR doit toujours se faire en sens unique entre des zones de travail séparées : préparation des mélanges mères (master mixes), suivie de la préparation des échantillons, puis amplification et enfin détection. L'autoclavage n'élimine pas l'ADN issu d'une contamination. N'introduire aucun ADN amplifié dans les zones réservées à la préparation des mélanges mères (master mixes) ou des échantillons. Toutes les pipettes et les pointes de pipette, ainsi que tout le matériel utilisé dans une zone particulière doivent être réservés à cette zone du laboratoire et ne jamais la quitter.
- Les articles non jetables doivent être décontaminés avec de l'eau de Javel à 10 % et rincés à l'eau distillée à deux reprises avant d'être replacés dans les zones où ils sont initialement utilisés. Le matériel plastique doit être jetable et stérile dans la mesure du possible pour éviter une contamination.

4.3. Conservation et manipulation

- Si le kit de test n'est pas utilisé immédiatement, il doit être conservé entre **-85 °C et -65 °C**.
- La température de conservation optimale des ADN contrôles est de 2°C à 8°C, mais les ADN contrôles peuvent également être conservés entre -85°C et -65°C.
- Tous les réactifs et les contrôles doivent être décongelés et agités ou mélangés soigneusement avant utilisation pour une remise en suspension complète. Un vortexage excessif pourrait endommager l'ADN et causer la perte des fluorophores des amorces marquées.
- Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.
- En raison de la concentration élevée en sel, les mélanges mères (master mixes) de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Si nécessaire, aliquoter les mélanges mères (master mixes) en cryotubes à bouchon à vis avec joint.

5. Instruments

5.1. Thermocycleur

- Utilisation ou fonction : amplification d'échantillons d'ADN
- Instrument suggéré : thermocycleur Veriti™ Dx ou équivalent
- Caractéristiques de performance et spécifications :
 - Plage de température minimale : 15 °C à 96 °C
 - Vitesse minimale de montée en température : 0,8 °C/s
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- Voir la section 7.4 *Amplification* pour le programme du thermocycleur.

5.2. ABI 3130/3130xl ou 3500/3500xL

- Utilisation ou fonction : détection et analyse de fragment
- Caractéristiques de performance et spécifications :
- Les instruments à électrophorèse capillaire suivants peuvent être utilisés pour ce test :
 - Analyseur génétique ABI 3130* (4 capillaires)
 - Analyseur génétique ABI 3130xl* (16 capillaires)
 - Analyseur génétique ABI 3500* (8 capillaires)
 - Analyseur génétique ABI 3500xL* (24 capillaires)
- Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.
- Les analyseurs génétiques doivent être calibrés avec le standard de matrice DS-33 Matrix Standard destiné au jeu de fluorophores Dye Set G5 (recommandé). Le standard de matrice DS-30 Matrix Standard pour le jeu de fluorophores Dye Set D peut être utilisé avec les séries 3130 (autre possibilité).
- Utiliser les paramètres par défaut correspondant à votre type de polymère et de capillaire.
- Voir la section 7.6 *Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI* pour la préparation des échantillons.

***Avertissement** : ces produits ne comportent pas le marquage CE.

6. Prélèvement et préparation des échantillons

6.1. Précautions

Les échantillons biologiques humains peuvent contenir des matériels potentiellement infectieux. Tous les échantillons doivent être manipulés conformément au programme de contrôle des pathogènes transmissibles par le sang de votre établissement ou au Niveau 2 de sécurité biologique.

6.2. Substances interférentes

Les substances suivantes sont connues pour interférer avec la PCR :

- Chélateurs de cations divalents
- Pointes de pipette à faible rétention
- EDTA (non significatif à faible concentration)
- Héparine
- Cellules en suspension dans un fixateur, par exemple l'acide acétique, le B5, etc.

6.3. Conditions de prélèvement et manipulation

Ce test analyse l'ADN génomique provenant des sources suivantes :

- Sang périphérique ou aspiration de moelle osseuse anticoagulée avec de l'héparine, de l'EDTA ou de l'ACD, ou cellules mononucléaires isolées auparavant fraîches dans un milieu approprié (RPMI ou similaire) ou congelées dans un milieu de cryoconservation approprié.
- Le sang périphérique et les aspirations de moelle osseuse peuvent être conservés entre 2°C et 8°C pendant 7 jours et donner encore des résultats fiables. Les cellules mononucléaires isolées peuvent être conservées pendant 7 jours maximum ou indéfiniment si une méthode de cryoconservation adéquate est utilisée.
- 500 ng d'ADN génomique (conservé entre 2°C et 8°C ou à une température inférieure à -15°C et expédié à température ambiante, dans des conditions fraîches ou sur de la glace sèche).

6.4. Préparation de l'échantillon

Extraire l'ADN génomique des échantillons du patient dès que possible. Les échantillons d'ADN sont calibrés pour une concentration finale de 50 µg/ml.

6.5. Conservation des échantillons

L'ADN génomique doit être conservé entre 2°C et 8°C ou à une température inférieure à -15°C.

7. Procédure de test

7.1. Matériel fourni

Voir le Tableau 2 pour le matériel fourni avec chaque kit.

7.2. Matériel nécessaire mais non fourni

Tableau 3. Matériel nécessaire mais non fourni

Réactif/Matériel	Réactifs ou matériels recommandés et fournisseurs	N° de référence	Remarques
ADN polymérase	Roche® : <ul style="list-style-type: none"> EagleTaq™ DNA Polymerase Invivoscribe, Inc. : <ul style="list-style-type: none"> FalconTaq DNA Polymerase ou équivalent 	05206944190 60970130	S.O.
Eau distillée déionisée de qualité biologie moléculaire ou USP	S.O.	S.O.	L'eau doit être stérile et exempte de toute DNase et RNase.
Pipettes calibrées	BIOHIT : <ul style="list-style-type: none"> Proline® eLine® Rainin : <ul style="list-style-type: none"> Pipettes P-2, P-20, P-200 et P-1000 ou pipettes SL-2, SL-20, SL-200 et SL-1000 	S.O.	Précision requise pour mesurer des volumes allant de 1 µl à 1 000 µl.
Thermocycleur	Life Technologies : <ul style="list-style-type: none"> Veriti™ Dx Thermal Cycler 	4452300	S.O.
Endonucléase EcoRV	New England Biolabs <ul style="list-style-type: none"> EcoRV 20 000 unités/ml 	R0195S ou R0195L	S.O.
NEBuffer 3.1	New England Biolabs <ul style="list-style-type: none"> NEBuffer 3.1 	B7203S	Inclus avec l'enzyme de restriction EcoRV
Vortex	S.O.	S.O.	S.O.
Plaques ou tubes PCR	S.O.	S.O.	Stériles
Pointes de pipette à filtre	S.O.	S.O.	Stériles, exempts de RNase/DNase/pyrogène
 Tubes microcentrifuges	S.O.	S.O.	Stériles
Instrument à électrophorèse capillaire ABI	Applied Biosystems® : <ul style="list-style-type: none"> Série d'analyseur génétique ABI 3130 Série d'analyseur génétique ABI 3500 	313001R ou 3130XLR 4406017 ou 4406016	S.O.
Formamide Hi-Di	Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> Formamide Hi-Di™ 	4440753	S.O.
Marqueurs de taille standard	Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> Recommandation pour les séries ABI 3130 et ABI 3500 : <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ 600™ LIZ® dye Size Standard v2.0 Alternative pour la série ABI 3130 : <ul style="list-style-type: none"> GeneScan - 400HD ROX™ dye Size Standard 	4408399 402985 ou 4310366	S.O.

Tableau 3. Matériel nécessaire mais non fourni

Réactif/Matériel	Réactifs ou matériels recommandés et fournisseurs	N° de référence	Remarques
Jeux de fluorophores (Dye sets) D ou G5 pour calibration spectrale	Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> Recommandation pour les séries ABI 3130 et ABI 3500 : <ul style="list-style-type: none"> DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) Alternative pour la série ABI 3130 : <ul style="list-style-type: none"> DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) 	4345833 4345827	S.O.
Polymère	Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> Polymère POP-7 : <ul style="list-style-type: none"> POP-7™ pour les séries 3130 POP-7™ pour les séries 3500 	4352759 ou 4363785 4393708, 4393714, ou A26073	S.O.
Tampon	Applied Biosystems : <ul style="list-style-type: none"> Pour les séries ABI 3130 : <ul style="list-style-type: none"> Tampon de migration 310 et 31xx Running Buffer, x10 Pour la série ABI 3500 : <ul style="list-style-type: none"> Anode Buffer Container 3500 Series Cathode Buffer Container 3500 Series 	402824 4393927 4408256	S.O.
Feuille d'aluminium pour plaque 96 puits	S.O.	S.O.	S.O.
Barrettes de 8 bouchons pour plaque 96 puits	S.O.	S.O.	S.O.

7.3. Préparation des réactifs

Facultatif : tous les échantillons inconnus peuvent être analysés avec le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder. Cela garantit que les échantillons d'ADN ne contiennent pas d'inhibiteur d'amplification et qu'ils sont de qualité adéquate et en quantité suffisante pour générer des résultats fiables. Le mélange mère (master mix) Specimen Control Size Ladder Master Mix peut être acheté séparément auprès d'Invivoscribe (**REF** : 20960021 pour la détection par ABI).

Les contrôles positifs, négatifs et sans ADN doivent être testés pour chaque mélange mère (master mix).

Mélanges d'amplification

- 7.3.1. Nettoyer la hotte de confinement avec de l'eau de Javel à 10 % puis de l'éthanol à 70 %.
- 7.3.2. Enfiler des gants et retirer les mélanges mères (master mixes) du congélateur. Laisser les tubes décongeler complètement (éviter l'exposition directe à la lumière) ; puis vortexer doucement ou mélanger par inversion 5 à 10 fois pour bien mélanger.
- 7.3.3. Sous la hotte de confinement, aliquoter un volume approprié de chaque mélange mère (master mix) dans des tubes microcentrifuges individuels propres et stériles.
 - Les volumes d'aliquot doivent être de 45 µl pour chaque réaction.
 - D'ajouter une réaction supplémentaire toutes les 15 réactions pour corriger les erreurs de pipetage.
 - Ainsi, pour chaque mélange mère (master mix), le nombre de réactions (n) doit être :

n =	1 × nb d'échantillons	
	+ 1	ADN contrôle positif (FLT3 Positive Control)
	+ 1	ADN contrôle négatif (FLT3 Negative Control)
	+ 1	contrôle négatif sans ADN (eau)
	+ 1	pour corriger les erreurs de pipetage
n =	b d'échantillons + 4	Total
 - Le volume d'aliquot total pour chaque mélange mère (master mix) doit être **n × 45 µl**.

- 7.3.4. Ajouter 1,25 unités (ou 0,25 µl à 5 unités/µl) d'ADN polymérase EagleTaq à chaque mélange mère (master mix) par réaction.
- La quantité d'ADN polymérase totale ajoutée à chaque mélange mère (master mix) doit être de **n × 0,25 µl**.
 - Retourner le tube plusieurs fois pour bien mélanger.
- 7.3.5. Pour chaque réaction, aliquoter 45 µl du mélange mère (master mix) approprié + la solution d'ADN polymérase dans les puits individuels d'une plaque ou dans un tube PCR.
- 7.3.6. Ajouter 5 µl de matrice appropriée (échantillon d'ADN à une concentration de 50 µg/ml, ADN contrôle positif, ADN contrôle négatif ou eau) aux puits individuels contenant les solutions de mélange mère (master mix) respectives.
- Aspirer et expulser 5 à 10 fois avec la pipette pour mélanger.
- 7.3.7. Reboucher ou couvrir la plaque PCR.
- Les échantillons sont maintenant prêts à être amplifiés dans le thermocycleur.

Tableau 4. Mise au point de la réaction

Réactif	Volume
Mélange mère (master mix)	45 µl
ADN polymérase EagleTaq	0,25 µl
Échantillon ou ADN contrôle	5 µl
Volume total	50,25 µl

7.4. Amplification

- 7.4.1. Amplifier les échantillons en utilisant le programme PCR suivant :

Tableau 5. Programme PCR

Étape	Température	Durée	Cycle
1	95°C	5 minutes	1
2	94°C	30 secondes	35 x
3	55°C	30 secondes	
4	72°C	60 secondes	
5	72°C	60 minutes	1
6	4°C	« infini »	1

- 7.4.2. Retirer la plaque ou les tubes d'amplification du thermocycleur.
- 7.4.3. Conserver les amplicons à une température comprise entre 2°C et 8°C jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être analysés avec l'instrument ABI 3130/3130xL ou ABI 3500/3500xL.

7.5. Digestion par enzyme de restriction pour le mélange mère (master mix) *FLT3D835* uniquement

- 7.5.1. Enfiler des gants et retirer le tampon NEBuffer 3.1 du congélateur. Le laisser décongeler complètement ; puis vortexer doucement pour mélanger.
- 7.5.2. Sous la hotte de confinement, ajouter les quantités ci-après dans des tubes microcentrifuges individuels propres et stériles.

- D'ajouter une réaction supplémentaire toutes les 15 réactions pour corriger les erreurs de pipetage.
- Ainsi, le nombre de réactions (**n**) doit être :

$$n = \frac{\text{nb d'échantillons}}{15} + 1 \quad \text{pour corriger les erreurs de pipetage}$$

$$n = \# \text{ nb d'échantillons} + 1 \text{ Total}$$

- 7.5.3. Ajouter 15,7 µl d'eau de qualité biologique moléculaire par réaction au tube.
- Le volume d'eau total ajouté doit être **n × 15,7 µl**.
- 7.5.4. Ajouter 2,3 µl de tampon NEBuffer 3.1 par réaction au tube.
- La quantité totale de tampon NEBuffer 3.1 ajouté doit être **n × 2,3 µl**.
- 7.5.5. Ajouter 2 µl d'endonucléase EcoRV (20 000 unités/ml) par réaction au tube.
- La quantité totale d'endonucléase EcoRV ajoutée doit être **n × 2 µl**.

- Vortexer doucement pour mélanger.
- 7.5.6. Pour chaque réaction, aliquoter 20 µl du mélange ci-dessus dans les puits individuels d'une plaque ou dans un tube PCR.
- 7.5.7. Ajouter 10 µl de chaque amplicon *FLT3* D835 aux puits correspondants contenant le mélange de digestion par enzyme de restriction.
 - Aspirer et expulser plusieurs fois avec la pipette pour mélanger.
- 7.5.8. Reboucher ou couvrir la plaque PCR.
- 7.5.9. Incuber à 37°C pendant au moins 60 minutes et 24 heures maximum.
 - Bien que l'ADN amplifié soit stable à température ambiante pour des périodes de temps prolongées, les produits PCR doivent être conservés entre 2°C et 8°C jusqu'à détection.
 - La détection doit être effectuée dans les 30 jours suivant l'amplification.

7.6. Détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI

Veillez noter qu'un pic précurseur est souvent visible lors de la détection par fluorescence à l'aide d'analyseurs ABI. Il s'agit d'un artefact dû à la méthode de détection employée par les plateformes ABI. Les pics précurseurs sont parfois incurvés et le côté droit de leurs bases penche vers le pic réel.

Avertissement : Nous ne recommandons pas le multiplexage de produits PCR provenant de mélanges mères (master mixes) différents car cela entraînerait une réduction de la sensibilité du test

- 7.6.1. Dans un tube microcentrifuge non utilisé, mélanger une quantité appropriée (pour un total de 10 µl par réaction PCR) de Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille 600 LIZ™ Size Standards v2.0. Bien vortexer.
- 7.6.2. Dans une plaque PCR à 96 puits, ajouter 10 µl de Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille 600 LIZ™ dans les puits individuels pour chaque réaction PCR.
- 7.6.3. Transférer 0,5 µl de chaque amplicon dans les puits contenant le Formamide Hi-Di avec les marqueurs de taille 600 LIZ™ size standards v2.0. Ajouter uniquement un échantillon par puits. Aspirer et expulser avec la pipette pour mélanger.
- 7.6.4. Sceller la plaque PCR avec la feuille d'aluminium ou les barrettes de 8 bouchons.
- 7.6.5. Dénaturer à la chaleur les échantillons à 95°C pendant 3 minutes, puis réfrigérer brusquement dans de la glace ou à 4°C pendant 5 minutes.
- 7.6.6. Préparer une liste des échantillons et une liste d'injection des échantillons.
- 7.6.7. Analyser les échantillons avec l'instrument à électrophorèse capillaire ABI conformément au manuel d'utilisation.
- 7.6.8. Les données sont automatiquement affichées sous forme de pics de taille et de couleur spécifiques. Passer en revue le profil et les contrôles, puis effectuer un rapport des résultats. (Voir les sections 8 : *Interprétation des résultats* et 10 : *Taille attendue des produits amplifiés* ci-dessous.)

7.7. Contrôle qualité

Les contrôles positifs et négatifs (ou normaux) sont fournis avec le kit et doivent être analysés une seule fois à chaque fois que l'analyse est réalisée pour assurer une performance correcte de l'analyse. De plus, un contrôle négatif sans ADN (par ex. de l'eau) doit aussi être inclus pour tester la contamination du mélange mère (master mix) ou la contamination croisée des réactions PCR due à une technique incorrecte. Un contrôle tampon peut aussi être ajouté afin de garantir l'absence de contamination du tampon employé pour remettre en suspension les échantillons. Les valeurs des contrôles positifs sont fournies dans la section 10 : *Taille attendue des produits amplifiés*.

8. Interprétation des résultats

Les résultats positifs et négatifs doivent être interprétés en tenant compte de toutes les informations cliniques et des résultats des analyses biologiques. La plage de taille attendue pour chaque mélange mère (master mix) a été déterminée en analysant les échantillons contrôles négatifs et positifs. Pour une interprétation précise et significative, il est important d'ignorer les pics situés en dehors de la plage de taille attendue de chaque mélange mère (master mix).

- Notez que selon l'instrument ABI, il peut exister une variabilité de +/-1 pb de la taille du fragment.

8.1. Analyse

- 8.1.1. Les échantillons pour lesquels l'amplification échoue après des essais répétés doivent être signalés comme suit « Aucun résultat ne peut être fourni concernant cet échantillon car il contenait de l'ADN en quantité ou qualité insuffisante pour l'analyse ».
- 8.1.2. Les amorces du mélange mère (master mix) *FLT3* ITD Master Mix comportent les mentions FAM (en bleu) et HEX (en vert), correspondant respectivement à l'amorce sens et antisens. Les pics de type sauvage (327 pb) et mutants (tout pic ≥ 330 pb) doivent comporter à la fois un pic bleu et le pic vert correspondant pour être considérés comme des pics effectifs.
- 8.1.3. Les amorces du mélange mère (master mix) *FLT3* TKD comportent uniquement la mention FAM. Un résultat *FLT3* TKD positif correspond à un pic mutant qui est ≥ 1 % du pic de type sauvage.
- Pour calculer cette valeur, diviser la hauteur du pic mutant (124 pb ou 127 pb pour les échantillons patient et 124 pb pour le contrôle positif) par la hauteur du pic de type sauvage (79 pb).
 - Un résultat négatif aura un pic mutant qui est $< 1,0$ % du pic de type sauvage.
- 8.1.4. Tous les contrôles des tests doivent être examinés avant l'interprétation des résultats des échantillons. Si les contrôles ne fournissent pas les résultats attendus, l'analyse n'est pas fiable et les échantillons ne doivent pas être interprétés.

Tableau 6. Le tableau suivant décrit l'analyse de chaque contrôle ainsi que les décisions nécessaires en fonction des résultats.

Type de contrôle	Résultat attendu	Résultat aberrant
Contrôle négatif sans ADN <i>FLT3</i> ITD	Aucun pic ≥ 100 RFU et supérieur à 50 pb.	Amplification présente, répéter le test.
Contrôle négatif <i>FLT3</i> ITD	Pic bleu et vert à 327 pb $\geq 4\ 500$ RFU	Amplification insuffisante, pic(s) positif(s) détecté(s) ; répéter le test.
Contrôle positif ITD <i>FLT3</i>	Pic bleu et vert à 327 pb $\geq 4\ 500$ RFU et un pic bleu et vert à 357 pb ≥ 100 RFU	Amplification insuffisante, pic mutant absent ; répéter le test.
Contrôle négatif sans ADN <i>FLT3</i> TKD	Aucun pic ≥ 100 RFU et supérieur à 50 pb.	Amplification présente, répéter le test.
Contrôle négatif <i>FLT3</i> TKD	Pic bleu à 79 pb $\geq 4\ 500$ RFU.	Amplification insuffisante, pic(s) positif(s) détecté(s) ; répéter le test.
Contrôle positif <i>FLT3</i> D835	Pic bleu à 79 pb $\geq 4\ 500$ RFU et un pic bleu à 124 pb ≥ 1 % du pic de type sauvage.	Amplification insuffisante, pic mutant $< 1,0$ % ; répéter le test.
Specimen Control Size Ladder (Facultatif)	Les pics de 96, 197, 297, 397 et 602 pb sont tous présents. Dans la mesure où les plus petits fragments PCR sont préférentiellement amplifiés, il n'est pas rare d'obtenir un signal diminué ou complètement absent pour le fragment de 600 pb. Continuer l'analyse.	Si aucun pic n'est visible, répéter le test <u>sauf si l'échantillon est positif.</u> Si seulement 1, 2 ou 3 pics sont visibles, évaluer de nouveau l'échantillon afin de détecter une éventuelle dégradation de l'ADN <u>sauf si l'échantillon est positif.</u>

8.2. Interprétation de l'échantillon

Dans la mesure où les contrôles produisent les résultats attendus, les échantillons cliniques doivent être interprétés comme suit :

Tableau 7. Interprétation de l'échantillon

Mélange mère (master mix) <i>FLT3</i> ITD :	
Positif :	La présence de pics mutants (FAM et HEX) ≥ 330 pb et ≥ 100 RFU est interprétée comme : « Détection d'une mutation ITD du gène <i>FLT3</i>. »
Négatif :	La présence du pic de type sauvage (FAM et HEX) à 327 pb ($\geq 4\ 500$ RFU) sans pic ≥ 330 pb et ≥ 100 RFU est interprétée comme : « Aucune preuve de mutation ITD du gène <i>FLT3</i>. »
Échec d'amplification :	Échec d'obtention d'un pic de type sauvage (327 pb pour FAM et HEX) $\geq 4\ 500$ RFU avec des échantillons négatifs.

Tableau 7. Interprétation de l'échantillon

Mélange mère (master mix) <i>FLT3</i> D835 :	
Positif :	La présence d'un pic mutant de 124 pb ou 127 pb (FAM) qui est $\geq 1,0$ % du pic de type sauvage de 79 pb est interprétée comme : « Détection d'une mutation TKD du gène <i>FLT3</i>. »
Négatif :	La présence du pic de type sauvage (FAM) à 79 pb ($\geq 4\ 500$ RFU), avec une présence du mutant $< 1,0$ % est interprétée comme : « Aucune preuve de mutation TKD du gène <i>FLT3</i>. »
Échec d'amplification :	Échec d'obtention d'un pic de type sauvage (FAM) $\geq 4\ 500$ RFU avec des échantillons négatifs.

9. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des mutations activatrices *FLT3*.
- Ce test ne peut détecter de manière fiable moins de 5 cellules positives pour 100 cellules normales.
- Les résultats des tests moléculaires doivent toujours être interprétés dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.
- Les analyses PCR sont sujettes à des interférences dues à la dégradation de l'ADN ou à l'inhibition de la PCR par l'EDTA, l'héparine ou d'autres agents.

10. Taille attendue des produits amplifiés

10.1. Taille attendue des produits amplifiés

- Les tailles des amplicons indiquées ont été déterminées en utilisant une plateforme ABI 3500xL. Les tailles d'amplicons visibles sur votre instrument à électrophorèse capillaire spécifique peuvent différer de 1 à 4 nucléotides (nt) de celles figurant ci-après selon la plateforme de détection et la version du logiciel d'analyse utilisé. Une fois identifiée, la taille de l'amplicon déterminée sur votre plateforme spécifique sera uniforme d'une analyse à l'autre. Cette reproductibilité est extrêmement utile pour surveiller la récurrence de la maladie.
- Remarque : « Couleur » indique la couleur des produits générée avec le mélange mère (master mix) en utilisant les paramètres de couleur par défaut des systèmes de détection par fluorescence ABI.

Tableau 8. Taille attendue des produits amplifiés pour le mélange mère (master mix) *FLT3*ITD

Mélange mère	Cible	Couleur	Échantillon	Taille du produit en nucléotides ²
<i>FLT3</i> ITD	ITD	Bleu & vert	Contrôle négatif sans ADN	Aucun pic > 100 RFU et supérieur à 50 pb.
		Bleu & vert	ADN contrôle négatif <i>FLT3</i>	Pic bleu et vert à 327 pb $\geq 4\ 500$ RFU
		Bleu & vert	Contrôle positif <i>FLT3</i> ITD	Pic bleu et vert à 327 pb $\geq 4\ 500$ RFU et un pic bleu et vert à 357 pb ≥ 100 RFU
		Bleu & vert	Échantillon patient négatif <i>FLT3</i> ITD	Pic bleu et vert à 327 pb $\geq 4\ 500$ RFU
		Bleu & vert	Échantillon patient positif <i>FLT3</i> ITD	Pic bleu et vert ≥ 330 pb ≥ 100 RFU Remarque : le pic de type sauvage à 327 pb peut être présent ou non.

Tableau 9. Taille attendue des produits amplifiés pour le mélange mère (master mix) *FLT3*TKD

Mélange mère	Cible	Couleur	Échantillon	Taille du produit en nucléotides ²
<i>FLT3</i> D835	TKD	Bleu	Contrôle négatif sans ADN	Aucun pic ≥ 100 RFU et supérieur à 50 pb.
		Bleu	ADN contrôle négatif <i>FLT3</i>	Pic bleu à 79 pb $\geq 4\ 500$ RFU
		Bleu	Contrôle positif <i>FLT3</i> D835	Pic bleu à 79 pb $\geq 4\ 500$ RFU et un pic bleu à 124 pb ≥ 1 % du pic de type sauvage
		Bleu	Échantillon patient négatif <i>FLT3</i> TKD	Pic bleu à 79 pb ≥ 4500 RFU
		Bleu	Échantillon patient positif <i>FLT3</i> TKD	Pic bleu à 124 pb ou 127 pb qui d'au moins 1 % du pic de type sauvage. Remarque : le pic de type sauvage à 79 pb peut être présent ou non.

Remarque sur l'interprétation TKD : une partie du produit EcoRV non digéré peut être présent et détectable comme un pic bleu à 147 pb. Si seul un pic de 147 pb est détecté ou que le pic de 147 pb est $\geq 1\%$ du pic de type sauvage, l'échantillon doit être analysé à nouveau en commençant par l'étape d'amplification ou l'étape de digestion d'EcoRV.

10.2. Données de l'échantillon

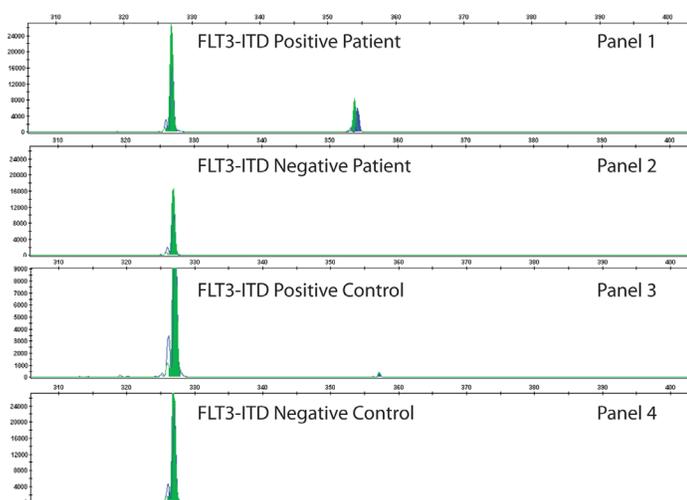
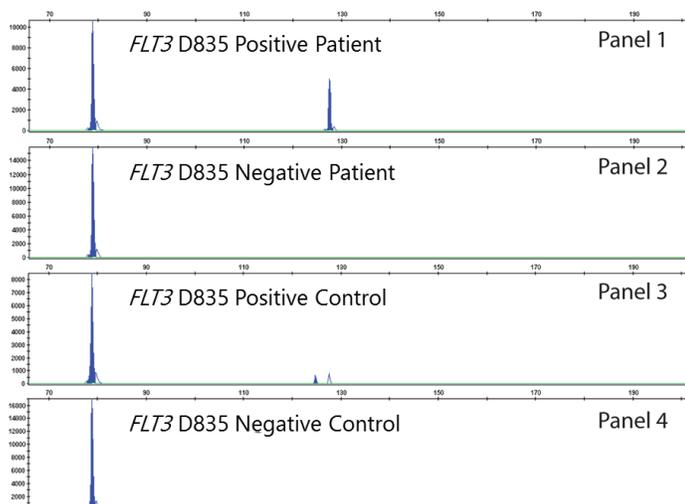


Figure 2. *FLT3* ITD mélanges mères. Les produits amplifiés ont été analysés sur un instrument ABI 3500xL. Pour le mélange mère (master mix) *FLT3* ITD, le groupe 1 représente les résultats obtenus en analysant un échantillon patient positif ; le groupe 2 représente les résultats obtenus en analysant un échantillon patient négatif ; le groupe 3 représente les résultats obtenus en analysant l'échantillon contrôle positif (REF 40883390) ; le groupe 4 représente les résultats obtenus en analysant l'échantillon contrôle négatif. (REF 40920030)

Figure 3. *FLT3* TKD D835 mélanges mères. Les produits amplifiés ont été analysés sur un instrument ABI 3500xL. Pour le mélange mère (master mix) *FLT3* ITD, le groupe 1 représente les résultats obtenus en analysant un échantillon patient positif ; le groupe 2 représente les résultats obtenus en analysant un échantillon patient négatif ; le groupe 3 représente les résultats obtenus en analysant l'échantillon contrôle positif (REF 40883390) ; le groupe 4 représente les résultats obtenus en analysant l'échantillon contrôle négatif. (REF 40920030)



11. Caractéristiques de performance

La validation du test LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 apporte la preuve que le test est capable de détecter les mutations ITD et TKD du gène *FLT3* avec une concordance $\geq 90\%$ par rapport au séquençage Roche®454. L'étude de validation a mis en question la capacité du test à identifier les mutations du gène *FLT3* tout en évaluant l'incidence de divers opérateurs, lots de réactifs, instruments ABU 3500xL et jours de test non consécutifs. Le pourcentage de concordance positif (PPA) et le pourcentage de concordance négatif (NPA) des échantillons cliniques, des échantillons positifs artificiels et des échantillons négatifs artificiels était supérieur à 90 % entre le test LeukoStrat® *FLT3* Mutation Assay 2.0 et les résultats de séquençage 454.

11.1. Résumé des données

Les échantillons artificiels *FLT3* ITD étaient composés d'échantillons ITD 5 % positif, ITD 50 % positif et ITD négatif. Chaque échantillon artificiel a été analysé de manière répétée à l'aide de deux lots de mélange mère (master mix) différents, sur 5 jours non consécutifs, produisant un total de 60 analyses répétées pour chaque échantillon artificiel. Un total de 10 échantillons cliniques a été analysé une seule fois à l'aide de deux lots de mélange mère (master mix) différents, sur 5 jours non consécutifs, produisant un total de 20 analyses répétées de chaque échantillon clinique. Conformément au protocole, les analyses comportant des contrôles en échec n'ont pas été incluses dans les analyses finales. Une concordance de 100 % et de 98 % ont été obtenues pour les échantillons artificiels et cliniques, respectivement (consulter le tableau 10 :

Taille de l'échantillon et concordance de l'échantillon ITD). Les contrôles positifs et négatifs n'ont pas été inclus dans les calculs. L'échantillon clinique ITD-6 a été classé de façon erronée dans 4 des 20 analyses répétées.

Tableau 10. Taille de l'échantillon et concordance de l'échantillon ITD avec le séquençage 454

Échantillon	Résultat	N	% de concordance	Commentaires
Contrôle positif	Positif	17	100 %	S.O.
5 % positif	Positif	51	100 %	S.O.
50 % positif	Positif	51	100 %	S.O.
ITD-1	Positif	17	100 %	S.O.
ITD-3	Positif	17	100 %	S.O.
ITD-4	Positif	17	100 %	S.O.
ITD-5	Positif	17	100 %	S.O.
ITD-6	Négatif	4	20 %	FAM (pics HEX de 101 à 113 RFU)
	Positif	13	80 %	
ITD-7	Positif	17	100 %	S.O.
Contrôle négatif	Négatif	17	100 %	S.O.
Négatif	Négatif	51	100 %	S.O.
ITD-2	Négatif	17	100 %	S.O.
ITD-8	Négatif	17	100 %	S.O.
ITD-9	Négatif	17	100 %	S.O.
ITD-10	Négatif	17	100 %	S.O.

Les échantillons artificiels *FLT3* TKD étaient composés d'échantillons TKD 5 % positif, TKD 50 % positif et TKD négatif. Chaque échantillon artificiel a été analysé de manière répétée à l'aide de deux lots de mélange mère (master mix) différents, sur 5 jours non consécutifs, produisant un total de 60 analyses répétées pour chaque échantillon artificiel. Un total de 10 échantillons cliniques a été analysé une seule fois à l'aide de deux lots de mélange mère (master mix) différents, sur 5 jours non consécutifs, produisant un total de 20 analyses répétées pour chaque échantillon clinique. Une concordance de 100 % a été obtenue pour les échantillons artificiels et cliniques (consulter le tableau 11 : Taille de l'échantillon et concordance de l'échantillon TKD). Les contrôles positifs et négatifs n'ont pas été inclus dans les calculs. Trois des 60 analyses répétées de l'échantillon artificiel TKD négatif n'ont pas obtenu d'amplification suffisante et ont ainsi été exclus de l'ensemble d'analyse NPA.

Tableau 11. Taille de l'échantillon et concordance de l'échantillon TKD avec le séquençage 454

Échantillon	Résultat	N	% de concordance	Commentaires (discordances)
Contrôle positif	Positif	20	100 %	S.O.
5 % positif	Positif	60	100 %	S.O.
50 % positif	Positif	60	100 %	S.O.
TKD-2	Positif	20	100 %	S.O.
TKD-3	Positif	20	100 %	S.O.
TKD-4	Positif	20	100 %	S.O.
TKD-6	Positif	20	100 %	S.O.
TKD-7	Positif	20	100 %	S.O.
TKD-10	Positif	20	100 %	S.O.
Contrôle négatif	Négatif	20	100 %	S.O.
Négatif	Négatif	57	100 %	3/60 (5 %) n'ont pas obtenu d'amplification suffisante
TKD-1	Négatif	20	100 %	S.O.
TKD-5	Négatif	20	100 %	S.O.
TKD-8	Négatif	20	100 %	S.O.
TKD-9	Négatif	20	100 %	S.O.

11.2. Analyse des données

Pour les échantillons *FLT3* ITD négatifs connus, aucun résultat discordant n'a été obtenu (concordance pour 119/119), produisant un NPA de 100 % (consulter le tableau 12 : Pourcentage de concordance ITD avec le séquençage 454).

Pour les échantillons *FLT3* ITD positifs connus, 4 résultats discordants ont été obtenus (concordance pour 200/204), produisant un PPA de 98,0 % (consulter le tableau 12 : Pourcentage de concordance ITD avec le séquençage 454).

L'échantillon clinique ITD-6 était un échantillon *FLT3* ITD positif connu d'après le séquençage 454, toutefois quatre des 20 analyses répétées effectuées à l'aide du test LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 ont donné des résultats négatifs.

Tableau 12. Pourcentage de concordance ITD avec le séquençage 454

Pourcentage de concordance		Nb d'échantillons discordants	Nb d'échantillons concordants	*LI à 95 %
NPA	100 %	0	119	96,9 %
PPA	98,0 %	4	200	95,1 %

*Il serait attendu que 95 % des résultats soient concordants avec le séquençage à un taux supérieur ou égal à la limite inférieure (LI).

Pour les échantillons *FLT3* TKD négatifs connus, aucun résultat discordant n'a été obtenu (137/137), produisant un NPA de 100 % (consulter le tableau 13 : Pourcentage de concordance TKD avec le séquençage 454) entre les résultats du séquençage 454 et le test LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0.

Pour les échantillons *FLT3* TKD positifs connus, aucun résultat discordant n'a été obtenu (240/240), produisant un PPA de 100 % (consulter le tableau 13 : Pourcentage de concordance TKD avec séquençage 454) entre les résultats du séquençage 454 et le test LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0.

Tableau 13. Pourcentage de concordance TKD avec séquençage 454

Pourcentage de concordance		Nb d'échantillons discordants	Nb d'échantillons concordants	*LI à 95 %
NPA	100 %	0	137	96,9 %
PPA	100 %	0	240	98,5 %

*Il serait attendu que 95 % des résultats soient concordants avec le séquençage à un taux supérieur ou égal à la limite inférieure (LI).

Le taux d'acceptabilité global pour *FLT3* ITD et *FLT3* TKD était respectivement de 85 % et 100 %. Les taux de validité de chaque échantillon pour ITD et TKD étaient respectivement de 85 % et 99,2 %.

11.3. Conclusion

Cette validation fournit des preuves documentées que le test LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 est capable de détecter les mutations ITD et TKD du gène *FLT3* avec une concordance minimale ≥ 90 % par rapport au séquençage 454.

12. Bibliographie

- Murphy, KM. et al., (2003). [Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay](#). The Journal of Molecular Diagnostics 5, 96 – 102.
- Yamamoto, Y. et al., (2001). [Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies](#). Blood 97, 2434-2439.

13. Service technique et service client

Coordonnées



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | États-Unis

Téléphone: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Heures d'ouverture: 7 h – 17 h heure du Pacifique

Service technique: support@invivoscribe.com | Service client: sales@invivoscribe.com | Site internet: www.invivoscribe.com

Les représentants du service technique et du service client sont disponibles du lundi au vendredi pour répondre à vos questions par téléphone, par e-mail ou sur le site Internet.

14. Symboles

Les symboles suivants sont utilisés pour l'étiquetage des produits de diagnostic d'Invivoscribe.

	Numéro de référence		Date de péremption
	Volume du réactif		Représentant agréé dans la Communauté européenne
	Numéro de lot		Consulter les instructions d'utilisation
	Conditions de conservation		Destiné au diagnostic <i>in vitro</i>
	Identifiant Unique de L'Appareil		Fabricante
	Conformité Britannique Évaluée		Personne responsable au Royaume-Uni
	Mandataire Suisse		Conformité Européenne

15. Informations légales

Ce produit est un produit de diagnostic *in vitro* ; pas disponible pour la vente ou l'utilisation en Amérique du Nord.

15.1. Garantie et responsabilité

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) s'engage à fournir des produits de la plus haute qualité. Invivoscribe® garantit que les produits respectent ou dépassent les normes de performance décrites dans les instructions d'utilisation, en ce qui concerne les produits avec un tel insert. Si un produit est couvert par les spécifications du produit et ne fonctionne pas comme spécifié, notre politique est de remplacer le produit ou de créditer le prix d'achat total. Aucune autre garantie de quelque nature que ce soit, expresse ou implicite, n'est fournie par Invivoscribe®. La responsabilité d'Invivoscribe® ne dépassera pas le prix d'achat du produit. Invivoscribe n'assume aucune responsabilité pour les dommages directs, indirects, consécutifs ou accessoires résultant de l'utilisation, des résultats de l'utilisation ou de l'impossibilité d'utiliser ses produits ; l'efficacité du produit dans des conditions contrôlées par l'acheteur dans le laboratoire de l'acheteur doit être établie et surveillée en permanence par le biais de processus définis et contrôlés par l'acheteur, y compris, mais sans s'y limiter, le test de contrôles positifs, négatifs et à blanc validés en interne chaque fois qu'un échantillon est testé. La commande, l'acceptation et l'utilisation du produit constituent l'acceptation par l'acheteur de la seule responsabilité d'assurer l'efficacité du produit et l'accord de l'acheteur à la limitation de responsabilité énoncée dans ce paragraphe.

15.2. Brevets et Marques

Beaucoup de ces produits nécessitent des méthodes d'amplification d'acide nucléique telles que la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Aucune licence en vertu de ces brevets pour l'utilisation de procédés d'amplification ou d'enzymes n'est transmise expressément ou implicitement à l'acheteur par l'achat de ce produit.

©2023 Invivoscribe, Inc. Tous droits réservés. Les marques commerciales mentionnées dans le présent document sont la propriété d'Invivoscribe, Inc. et/ou de ses sociétés affiliées, ou (en ce qui concerne les marques commerciales d'autres personnes utilisées dans le présent document) de leurs propriétaires respectifs.