LeukoStrat®

Instruções de uso

LeukoStrat® *FLT3* Mutation Assay 2.0

CE UKCA IVD

Para eudentificação de FMS relacionou-se a tirosina quinase 3 (*FLT3*) mutações internas do tandem da duplicação (ITD) e mutações do domínio da quinase do tirosina (TKD) .

IVD Este ensaio destina-se a diagnósticos *in vitro*.

invivoscribe®

Condições de armazenamento: **-85ºC a -65ºC**
(Os controlos de ADN podem ser separados dos kits de ensaio e armazenados a 2°C y 8°C)

N.º de catálogo	Produtos	Quantidade
REF 94120091	LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection	33 reacciones

Índice

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA 3

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO ENSAIO 3

2.1. Fundo 3
2.2. Resumo 3

3. PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO 3

3.1. Duplicação Interna em Tandem (ITD) Mutações de *FLT3* 3
3.2. Tyrosine Kinase Domínio (TKD) Mutações de *FLT3* 4
3.3. Detecção de Fluorescência Diferencial 4

4. REAGENTES 5

4.1. Componentes dos Reagente 5
4.2. Advertencias y Precauciones 6
4.3. Armazenamento e Manuseamento 6

5. EQUIPAMENTOS 7

5.1. Termociclador 7
5.2. ABI 3130/3130xl o 3500/3500xL 7

6. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS 8

6.1. Precauções 8
6.2. Substâncias Interferentes 8
6.3. Requisitos e Manuseamento de Amostras 8
6.4. Preparação da Amostra 8
6.5. Armazenamento de Amostra 8

7. PROCEDIMENTO DE ENSAIO 9

7.1. Materiales Suministrados 9
7.2. Materiales Necesarios no Suministrados 9
7.3. Preparação de Reagentes 10
7.4. Amplificação 11
7.5. Digest de Restrição para *FLT3* D835 Master Mix Somente 11
7.6. Detecção de Fluorescência ABI 12
7.7. Controle de Qualidade 12

8. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS 12

8.1. Análise 12
8.2. Interpretação da Amostra 13

9. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO 13

10. TAMANHO ESPERADO DE PRODUTOS AMPLIFICADOS 14

10.1. Tamanho esperado dos produtos amplificados 14
10.2. Dados de exemplo 15

11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO 16

11.1. Resumo dos Datos 16
11.2. Análise dos Datos 17
11.3. Conclusão 17

12. REFERÊNCIAS 18

13. TÉCNICO E ATENDIMENTO AO CLIENTE 18

14. SÍMBOLOS 18

15. AVISO LEGAL 19

15.1. Garantia e Responsabilidade 19
15.2. Patentes e marcas registradas 19

1. Utilização Pretendida

O ensaio 2,0 da mutação de LeukoStrat *FLT3* é um produto in vitro diagnóstico pretendido para a deteção PCR-baseada de mutações de activação *FLT3* nos pacientes com leucemia Myelogenous aguda (AML).

Especificamente, o ensaio de mutação *FLT3* 2,0 pode ser usado para:

- Identifique duplicações tandem internas (ITD) no gene *FLT3*.
- Identifique mutações do domínio da quinase do tirosina (TKD) no gene *FLT3*.

2. Resumo e Explicação do Ensaio

2.1. Fundo

A Leucemia Myeloid Aguda (AML) geralmente tem um prognóstico pobre. A avaliação do estado de mutação do gene do receptor *FLT3* (FMS relacionado tirosina quinase 3) no karyotype AML normal é o indicador prognóstico o mais importante do resultado da doença, que é frequentemente substancial, porque muitos estudos em AML mostraram que o a presença de mutações de activação *FLT3* prenuncia um prognóstico pobre.[1,2] Por esta razão *FLT3* teste de mutação de ativação é necessário para estratificar a doença e determinar as opções de tratamento apropriadas. Este ensaio do PCR de leukostrat segmenta regiões do gene *FLT3* para identificar mutações internas do tandem da duplicação (ITD) e mutações do domínio da quinase do tirosina (TKD), tais como o D835 e o I836.

2.2. Resumo

Este ensaio não pode detectar confiantemente *FLT3* mutações que compreendem menos de 5% da população total da pilha. Ressalta-se que os resultados dos testes de mutação molecular devem ser sempre interpretados no contexto de dados clínicos, histológicos e imunofenotípicos.

Este jogo do teste inclui duas misturas mestras principais: a mistura mestra de *FLT3* ITD para a deteção de mutações em tandem internas da duplicação e de *FLT3* D835 mistura mestra para a deteção de mutações da região de TKD (tais como as mutações D835 e I836).

3. Princípios do procedimento

3.1. Duplicação Interna em Tandem (ITD) Mutações de *FLT3*

FLT3 duplicação interna em tandem ou mutações de comprimento são causadas pela duplicação e inserção de uma porção do gene *FLT3* que inclui a região e ao redor da região de receptor (JM) do gene *FLT3*. Estas mutações variam na posição e no comprimento da seqüência duplicada introduzida do ADN. Mutações de ITD resultam em autofosforilação constitutiva e ativação de *FLT3*.[1] º Selvagem *FLT3* alelos irá amplificar e produzir um 327 pares de base (pb) produto usando este ensaio, enquanto alelos que contêm mutações ITD produzirá um produto ≥ 330 pb.

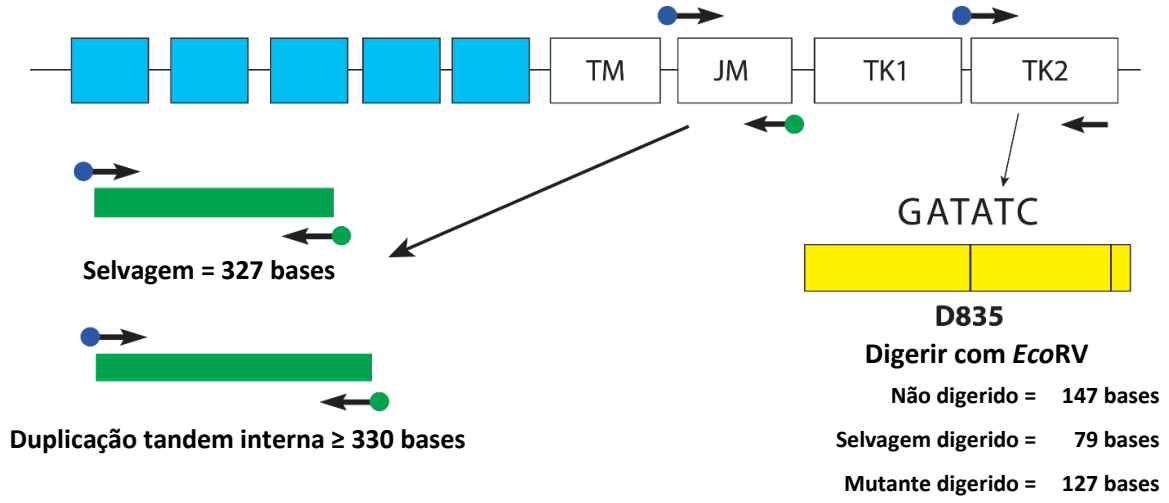


Figura 1. Representado é uma representação da região *FLT3* JM e o loop de ativação do domínio quinase. Pontos verdes e azuis com setas pretas representam as posições relativas de primers que visam a região JM para ITD e o ponto azul remanescente e setas pretas representam as posições relativas dos primers que visam mutações TKD no loop de ativação da quinase Domínio. A caixa amarela tem linhas pretas verticais que representam a posição dos locais de Digest de restrição EcoRV de tipo selvagem.

3.2. Tyrosine Kinase Domínio (TKD) Mutações de *FLT3*

As mutações do domínio da quinase de *FLT3* tirosina (TKD) são causadas por substituições do ácido nucleico que resultam em uma mudança na seqüência do aminoácido neste centro catalítico altamente conservado. Mutações TKD, como D835 e I836, resultam em autofosforilação constitutiva e ativação de *FLT3*.[2] Os alelos do selvagem gene *FLT3* incluem um site de Resumo de restrição EcoRV. Quando ocorre uma substituição de ácido nucleico, o site de reconhecimento de Digest de restrição desaparece e a endonuclease EcoRV não consegue identificar e digerir o ADN neste site. Nossos testes usam primers que se encontram em ambos os lados da região TKD. A região do alvo *FLT3* é amplificada usando o PCR e então um Sumário da limitação de EcoRV é executado. Um dos primers do PCR contem um local da limitação de EcoRV, assim que o tipo selvagem e os alelos do mutante são digeridos. O teste padrão da digestão identifica a perda da seqüência normal do gene e assegura-se de que a digestão ocorra. Alelos do selvagem gene *FLT3* produzem produtos de 79 pb e os alelos mutantes produzem produtos de 124 pb ou 127 pb. Os amplicões não digeridos são 147 pb (os comprimentos do produto correspondem aos resultados obtidos através do uso de Genescan™ - 600™ LIZ tamanho padrão v2,0 e o instrumento ABI 3500xL. O uso de diferentes padrões de tamanho e instrumentos pode produzir diferentes tamanhos de produtos).

3.3. Detecção de Fluorescência Diferencial

A deteção diferencial da fluorescência é usada geralmente para resolver os produtos diferente-feitos medida do amplicon usando um instrumento capilar da electroforese. Os primers podem ser conjugados com vários corantes fluorescentes diferentes (fluorophors) para que possam produzir diferentes espectros de emissão após a excitação por um laser no instrumento de eletroforese capilar. Desta maneira, as tinturas fluorescentes diferentes podem corresponder às regiões alvejadas diferentes. Este sistema de detecção resulta em alta sensibilidade, resolução de nucleotídeo único, detecção de produto diferencial e quantificação relativa. Além disso, o uso de géis de agarose e poliacrilamida, bem como o uso de carcinógenos, como brometo de etídio, podem ser praticamente eliminados. Além disso, a detecção diferencial permite uma interpretação precisa, reprodutível e objetiva de produtos específicos da cartilha e arquivamento automático de dados. A reprodutibilidade inter-Assay e intra-assay na determinação do tamanho usando a electroforese capilar é aproximadamente 1 a 2 nucleotides. Esta reprodutibilidade e sensibilidade juntamente com o arquivamento automático de dados de amostra permite o monitoramento, rastreamento e comparação de dados de pacientes individuais ao longo do tempo.

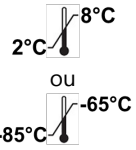
4. Reagentes

4.1. Componentes dos Reagente

Tabela 1. Kits Disponíveis

Ref. Catálogo	Descrição	Total de Reações
REF 94120091	LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 Kit – ABI Fluorescence Detection	33

Tabela 2. Componentes dos Ensaio LeukoStrat *FLT3* Mutation 2,0 kits

Reactivo	Número de catálogo	Componentes dos Reagentes	Quantidade Unitária	Número de Unidades	Temperatura de Armazenamento
Master Mixes	24120011CE	***FLT3* ITD Master Mix - 6FAM & HEX** Oligonucleotídeos múltiplos que alvejam o gene *FLT3* em uma solução de sal tamponada.	1500 µl	1	
	24120031CE	**FLT3 D835 Master Mix - 6FAM** Oligonucleotídeos múltiplos que alvejam o região TKD *FLT3* em uma solução de sal tamponada.	1500 µl	1	
ADN de control positivo	40883390	***FLT3* ITD Control Positivo** 50 µg/ml de ADN em 1/10° TE solução	100 µl	1	
	40883400	***FLT3* D835 Positive Control** 50 µg/ml de ADN plasmidial em 1/10° TE solução	100 µl	1	
ADN de controlo negativo (normal)	4-092-0030	***FLT3* controle negativo** 50 µg/ml de ADN em 1/10° TE solução	100 µl	1	

4.2. Advertencias y Precauciones

¡IMPORTANTE! Leia atentamente as Instruções de Utilização antes de iniciar o procedimento de ensaio e siga rigorosamente cada passo.

- IVD Este produto destina-se a diagnósticos in vitro.
- Este kit de ensaio deve ser utilizado como um sistema. Não substitua os reagentes com os de outros fabricantes. A diluição, redução das reações de amplificação ou outros desvios deste protocolo podem afetar o desempenho desta análise e/ou anular qualquer sublicença limitada que acompanha a compra destes kits.
- Os materiais são estáveis até à data de validade indicada no rótulo, quando armazenados e manuseados como indicado. Não utilize os kits após a sua data de validade.
- O cumprimento do protocolo irá garantir um desempenho e reprodutibilidade ótimos. Certifique-se que são usados os programas corretos do termociclador, uma vez que outros programas poderão fornecer dados imprecisos/erróneos, tais como resultados falsos positivos e falsos negativos.
- Não misture nem combine reagentes de kits com diferentes números de lote.
- Elimine os reagentes não usados e os resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, federais, estatais e locais.
- Todos os procedimentos laboratoriais devem ser realizados com equipamento de proteção individual padrão (luvas, batas de laboratório e proteção ocular). Siga as boas práticas laboratoriais e precauções universais ao trabalhar com amostras. Não pipete com a boca. Não coma, beba ou fume nas áreas de trabalho do laboratório. Lave bem as mãos após manusear as amostras e os reagentes dos ensaios. As amostras devem ser manuseadas em instalações de contenção de segurança biológica aprovadas e só devem ser abertas em câmaras de segurança biológica certificadas. É recomendada a utilização de água para biologia molecular para a preparação do ADN de amostra.
- Devido à elevada sensibilidade analítica desta análise, deve ser tomado extremo cuidado para evitar qualquer contaminação dos reagentes ou misturas de amplificação com amostras, controlos ou materiais amplificados. Use pontas de pipeta novas e resistentes a aerossóis para cada amostra e cada reagente. Todos os reagentes devem ser cuidadosamente controlados para sinais de contaminação (*p. ex.*, controlos negativos que originam sinais positivos). Elimine quaisquer reagentes suspeitos de contaminação.
- Para minimizar a contaminação, utilize luvas limpas ao manusear amostras e reagentes e limpe regularmente as áreas de trabalho e as pipetas antes de configurar o PCR.
- O fluxo de trabalho no laboratório de PCR deve ser unidirecional entre as áreas de trabalho separadas: começando pela preparação da master mix, passando para a preparação das amostras e, em seguida, para a amplificação e, finalmente, para a deteção. A autoclavagem não elimina a contaminação de ADN. As etapas pré e pós-PCR devem ser realizadas em espaços separados. Evite mover papel e outros materiais da área pós-PCR para o espaço pré-PCR.
- Todas as pipetas, pontas de pipeta e equipamentos utilizados numa determinada área devem ser exclusivos dessa área do laboratório.
- Os artigos não descartáveis devem ser descontaminados em lixívia a 10% e enxaguados com água destilada duas vezes antes de os devolver às áreas iniciais.
- Sempre que possível, deve ser utilizado material plástico estéril e descartável, para evitar a contaminação.

4.3. Armazenamento e Manuseamento

- Armazene o ensaio entre **-85ºC e -65ºC** até que esteja pronto para ser utilizado.
- A temperatura de armazenamento ótima para os controlos de ADN é entre 2°C e 8°C, mas o ADN também pode ser armazenado entre -85°C e -65°C.
- Todos os reagentes e controlos devem ser descongelados e misturados em vórtex, ou completamente misturados, antes da utilização de forma a assegurar que estão completamente ressuspensos.
- Os materiais são estáveis até a data de validade indicada quando armazenados e manuseados conforme as instruções. Não use kits além de sua data de validade.
- Devido a elevadas concentrações de sal, as master mixes de PCR são sensíveis aos ciclos de congelamento/descongelamento. O número de ciclos deve ser limitado a um máximo de cinco.

5. Equipamentos

5.1. Termociclador

- Uso ou função: amplificação de amostras de ADN
- Instrumento sugerido: Veriti™ Dx Termocicladorr ou equivalente
- Características de desempenho e especificação:
  - Gama térmica mínima: 15°C a 96°C
  - Velocidade de rampa mínima: 0,8°C/s
- Siga os procedimentos de instalação, operação, calibração e manutenção do fabricante.
- Ver secção 7.4 *Amplificação* para o programa termociclador.

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

- Uso ou função: detecção e análise de fragmentos
- Performance Characteristics and Specification:
- Os seguintes instrumentos capilares da electroforese atenderá às necessidades do desempenho para este ensaio:
  - ABI 3130 analisador genético * (4-capilares)
  - ABI 3130xl Genetic Analyzer* (16-capillaries)
  - ABI 3500 Genetic Analyzer* (8-capillaries)
  - ABI 3500xL Genetic Analyzer* (24-capillaries)
- Siga os procedimentos de instalação, operação, calibração e manutenção do fabricante.
- Os analisadores genéticos devem ser calibrados com o padrão DS-33 Matrix para o conjunto de corante G5 (recomendado). DS-30 Matrix padrão para Dye Set D pode ser usado com a série 3130 (opção alternativa).
- Use as configurações padrão para o seu tipo de polímero e capilar.
- Ver secção 7.6 *Detecção de fluorescência ABI* para preparação da amostra.

***Aviso:** Estes produtos não possuem a marcação CE

6. Recolha e Preparação de Amostras

6.1. Precauções

As amostras biológicas de seres humanos podem conter materiais potencialmente infeciosos. Todas as amostras devem ser manuseadas de acordo com o programa de Agentes Patogénicos Transmitidos pelo Sangue do seu instituto e/ou de acordo com o Nível 2 de Biossegurança.

6.2. Substâncias Interferentes

As seguintes substâncias são conhecidas por interferir com a PCR:

- Quelantes de catiões divalentes
- Pontas de pipeta de baixa retenção
- EDTA (não significativo em baixas concentrações)
- Heparina
- Células suspensas em um fixador, como o ácido acético, B5, etc.

6.3. Requisitos e Manuseamento de Amostras

Este ensaio testa o ADN genómico das seguintes fontes:

- Sangue periférico ou medula óssea aspirado anticoagulado com heparina, EDTA, ACD ou células mononucleares previamente isoladas que são frescas em uma mídia apropriada (RPMI ou similar) ou congeladas em um meio de criopreservação apropriado.
- Os aspirados periféricos de sangue e medula óssea podem ser armazenados a 2°C a 8°C durante 7 dias e ainda dar resultados válidos. Células mononucleares isoladas podem ser armazenadas frescas por até 7 dias ou indefinidamente se adequadamente criopreservadas.
- 500 ng do ADN genomic (armazenado em 2°C a 8°C ou abaixo de -15°C e enviado na temperatura ambiental, em circunstâncias frescas, ou no gelo seco).

6.4. Preparação da Amostra

Extraia o ADN genomic dos espécimes pacientes o mais cedo possível. As amostras de ADN são padronizadas para uma concentração final de 50 µg/ml.

6.5. Armazenamento de Amostra

O ADN genómico deve ser armazenado em 2°C a 8°C ou abaixo de -15°C.

7. Procedimento de Ensaio

7.1. Materiales Suministrados

Véase la Tabela 2 para consultar los materiales suministrados en cada kit.

7.2. Materiales Necesarios no Suministrados

Tabela 3. Materiais Necessários (não incluídos)

Reagente/Material	Reagentes/Fornecedores Necessários e/ou Recomendados	Ref. Catálogo	Notas
Polimerase do ADN	Roche®: • ADN polimerase EagleTaq™ Invivoscribe, Inc.: • FalconTaq DNA Polymerase ou equivalente	05206944190 60970130	N/A
Água grado USP o água de grado biología molecular desionizada y destilada en vidrio	N/A	N/A	El água debe sem esterilizados e ARNase/ADNase/pirogénios
Pipetas calibradas	BIOHIT: • Proline® • eLine® Rainin: • Pipetas P-2, P-20, P-200 e P-1000 o • Pipetas SL-2, SL-20, SL-200 e SL-1000	N/A	Devem ser capazes de medir com precisão volumes entre 0,2 µl e 1000 µl
Termociclador	Life Technologies: • Veriti™ Dx Thermal Cycler	4452300	N/A
Endonuclease EcoRV	New England Biolabs • EcoRV 20.000 unidades/ml	R0195S ou R0195L	N/A
NEBuffer 3.1	New England Biolabs • NEBuffer 3.1	B7203S	Incluido con la enzima de restrição EcoRV
Agitador vórtex	N/A	N/A	N/A
Placas o tubos para PCR	N/A	N/A	Estéril
Pontas de pipeta com filtro	N/A	N/A	Esterilizadas, sem ARNase/ADNase/pirogénios
Tubos de microcentrifugadora	N/A	N/A	Esterilizados
Instrumento capilar da electroforese de ABI	Applied Biosystems®: • Série ABI 3130 Genetic Analyzer • Série ABI 3500 Genetic Analyzer	313001R o 3130XLR 4406017 o 4406016	N/A
Formamide Hi-Di	Applied Biosystems: • Formamida™ Hi-Di	4440753	N/A
Padrões de tamanho	Applied Biosystems: • Recomende para las séries ABI 3130 e ABI 3500: ○ GeneScan™ 600™ LIZ® dye tamanho padrão v2.0 • Suplente para la série ABI 3130: ○ Padrão do tamanho da tintura de GeneScan - 400HD ROX™	4408399 402985 o 4310366	N/A
Spectral CalibraçãoDye Set D ou G5	Applied Biosystems: • Recomende para las série ABI 3130 y ABI 3500: ○ DS-33 Matrix Kit Padrão (conjunto de corante G5) • Suplente para la série ABI 3130: ○ DS-30 Matrix Kit Padrão (conjunto de corante D)	4345833 4345827	N/A

Tabela 3. Materiais Necessários (não incluídos)

Reagente/Material	Reagentes/Fornecedores Necessários e/ou Recomendados	Ref. Catálogo	Notas
Polímero	Applied Biosystems: • Polímero POP-7™: o POP-7 para la série 3130 o POP-7 para la série 3500	4352759 ou 4363785 4393708 ou 4393714 ou A26073	N/A
Solución tampón	Applied Biosystems: • Para la série ABI 3130: o 310 e 31xx Running Buffer, 10x • Para la série ABI 3500: o Recipiente do tampão do ânodo 3500 Séries o Recipiente do tampão do câthodo 3500 Séries	402824 4393927 4408256	N/A
96-folha de alumínio bem folha	N/A	N/A	N/A
96-bem 8-Cap tiras	N/A	N/A	N/A

7.3. Preparação de Reagentes

Utilize sempre controlos positivo, negativo, e nenhum para garantir que o ensaio foi realizado corretamente.

Opcional: Para garantir que as amostras de ADN não contêm inibidores de PCR e têm uma qualidade e quantidade suficiente para gerar um resultado válido, estas podem ser analisadas com a Specimen Control Size Ladder da Invivoscribe (REF 20960021 para deteção ABI).

Misturas de amplificação

7.3.1. Limpe a caixa de ar inoperante com o alvejante de 10% seguido pela água seguida pelo etanol de 70%.

7.3.2. Usando as mãos enluvado, remova as misturas mestras do congelador. Permita que os tubos descongele completamente (Evite a exposição direta à luz); em seguida, suavemente Vortex ou inverter tubo 5-10 vezes para misturar adequadamente.

7.3.3. Na capa de contenção ou na caixa de ar inoperante Remova uma alíquota apropriada de cada mistura mestra aos tubos limpos, estéreis individuais do microcentrifugador.

- Os volumes alíquotas devem ser 45 µl para cada reação.
- Adicionar uma reacção adicional para cada 15 reacções para corrigir erros de pipetagem.
- Assim, para cada mistura mestra, o número de reações (**n**) deve ser:

n =	**1 × n.º de amostras**	
	+ 1	ADN de controle positivo (***FLT3* controle positivo**)
	+ 1	ADN de controle negativo (***FLT3* controle negativo**)
	+ 1	nenhum control de modelo (água)
	+ 1	para corrigir erros de pipetagem
n =	**n.º de amostras + 4 Total**	

- Portanto, el volume de alíquota total para cada Master Mix reacción deve ser de n × 45 µl.

7.3.4. Adicionar 1,25 unidades (ou 0,25 µl em 5 unidades/µl) de feletaq ADN polimerase por reação a cada mistura mestre.

- O polymerase de ADN total adicionado a cada mistura mestra deve ser tubo de **n × 0,25 µl**.
- Inverter diversas vezes para misturar adequadamente.

7.3.5. Para cada reação, alíquota 45 µl da mistura mestra apropriada + solução do polymerase do ADN em poços individuais em uma placa ou em um tubo do PCR.

7.3.6. Adicionar 5 µl de modelo apropriado (ADN de amostra em uma concentração de 50 µg/ml, ADN de controle positivo, ADN de controle negativo, ou água) para os poços individuais contendo as respectivas soluções Master Mix.

- Pipeta para cima e para baixo 5-10 vezes para misturar.

7.3.7. Tampa ou cubra a placa do PCR.

- As amostras estão agora prontas para serem amplificadas em um termocicer.

Tabela 4. Preparação da Reação

Reagente	Volumen
Master Mix	45 µl
Polimerase do ADN Taq	0,25 µl
ADN de Amostra ou Controlo	5 µl
Total	**50,25 µl**

7.4. Amplificação

7.4.1. Amplifique as amostras utilizando o programa de PCR:

Tabela 5. Programa de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
1	95 °C	5 minutos	1
2	94 °C	30 segundos	35x
3	55 °C	30 segundos	
4	72 °C	60 segundos	
5	72 °C	60 minutos	1
6	4 °C	∞	1

7.4.2. Retire a placa de amplificação ou os tubos do termocicer.

7.4.3. Armazene os amplicões entre 2°C a 8°C até que esteja pronto para a análise no ABI 3130/3130xl ou no ABI 3500/3500xL.

7.5. Digest de Restrição para *FLT3* D835 Master Mix Somente

7.5.1. Usando as mãos enluvadas, remova o NEBuffer 3.1 do freezer. Deixe-o descongelar completamente; então, suavemente Vortex para misturar.

7.5.2. Na capa de contenção ou na caixa de ar inoperante adicione o seguinte a um tubo limpo, estéril individual do microcentrifugador.

- Recomendamos adicionar uma reação adicional para cada 15 reações para corrigir erros de pipetagem.
- Assim, o número de reações (**n**) deve ser:

$$\mathbf{n} = \frac{\mathbf{1 \times n.^{o}\ de\ amostras} + \mathbf{1}}{\mathbf{n.^{o}\ de\ amostras + 1\ Total}} \quad \text{para corrigir erros de pipetagem}$$

7.5.3. Adicionar 15,7 µl de água de grau molecular por reação ao tubo.

- O volume total de água adicionado deve ser **n × 15,7 µl**.

7.5.4. Adicionar 2,3 µl de NEBuffer 3.1 por reacción al tubo.

- O volume total de NEBuffer 3.1 adicionado deve ser **n × 2,3 µl**.

7.5.5. Adicionar 2 µl de endonuclease EcoRV (20.000 unidades/ml) por reacción al tubo.

- O volume total de endonuclease EcoRV adicionado deve ser **n × 2 µl.**
- Vortex com suavemente com el agitador.

7.5.6. Para cada r reação, aliquotar 20 µl d da mistura acima em poços individuais em uma placa ou tubo de PCR.

7.5.7. Adicionar 10 µl de cada amplicón *FLT3* D835 aus seus poços correspondentes contendo a mostura de digerir de restrição.

- Pipeta para cima e para baixo várias vezes para misturar.

7.5.8. Tampe ou cubra a placa de PCR.

7.5.9. Incubar a 37°C po pelo menos 60 minutos e até 24 horas.

- Embora o ADN amplificado seja estável à temperatura ambiente por longos períodos de tempo, os produtos de PCR devem ser armazenados em 2°C a 8°C té a detecção.
- A detecção deve estar dentro de 30 dias após a amplificação.

7.6. Detecção de Fluorescência ABI

Anote por favor que para a deteção da fluorescência do ABI um pico precedente é visto frequentemente e é um artefato devido ao método de deteção que as plataformas ABI usam. Os picos precedentes são às vezes distorcida e têm bases que inclinam-se no lado direito para o pico real.

Aviso: Nós não recomendamos a multiplexação de produtos de PCR de diferentes mestre misturas em conjunto, pois isso resultará em total redução da sensibilidade do ensaio.

7.6.1. Em um novo tubo de microcentrífuga, misture uma quantidade apropriada (para um total de 10 µl por reação de PCR) de Hi-di formamide com 600 padrões de tamanho de LIZ v2.0. Vortex bem.
7.6.2. Em uma placa nova do PCR do 96-well, adicione 10 litros do Hi-di formamide com 600 padrões do tamanho de LIZ v2.0 aos poços individuais para cada reação do PCR.
7.6.3. Transferir 0,5 µl de cada amplicon para os poços contendo Hi-di formamide com 600 padrões de tamanho LIZ v2.0. Adicione apenas uma amostra por poço. Pipette up and down to mix.
7.6.4. Sele a placa do PCR com folha de alumínio ou tiras do PCR de 8-Cap.
7.6.5. Aqueça as amostras a 95 º C durante 3 minutos e, em seguida, encaixe o frio no gelo ou a 4 c durante 5 minutos.
7.6.6. Prepare uma **folha de amostra** e uma **lista de injeção** para as amostras.
7.6.7. Execute as amostras em um instrumento capilar da electroforese de ABI de acordo com o manual do usuário.
7.6.8. Os dados são exibidos automaticamente como picos específicos de tamanho e cor. Revise o perfil e os controles, relate os resultados. (Ver secções 8: *Interpretação dos Resultados* e 10: *Tamanho Esperado dos Produtos Amplificados* abaixo.)

7.7. Controle de Qualidade

Controles positivos e negativos (ou normais) são fornecidos com o kit e devem ser executados em singlicate cada vez que o ensaio é realizado para garantir o desempenho adequado do ensaio. Além disso, um controle sem modelo (por exemplo, água) também deve ser incluído para testar a contaminação da mistura mestra ou contaminação cruzada de reações de PCR devido a técnica inadequada. Um controle de buffer também pode ser adicionado para garantir que nenhuma contaminação do buffer usado para suspender as amostras ocorreu. Os valores para os controles positivos são fornecidos a seção 10: *Tamanho Esperado dos Produtos Amplificados.*

8. Interpretação dos Resultados

Os resultados positivos e negativos devem ser interpretados no contexto de todas as informações clínicas e resultados de exames laboratoriais. A escala do tamanho para cada uma das misturas mestras foi determinada testando amostras positivas e negativas do controle. Para uma interpretação precisa e significativa, é importante ignorar os picos que ocorrem fora do intervalo de tamanho válido para cada uma das misturas mestras.

- Observe que, inerente ao instrumento ABI, pode haver uma variabilidade de +/-1 pb no tamanho de um fragmento.

8.1. Análise

8.1.1. As amostras que não conseguem amplificar após o teste de repetição devem ser relatadas como "um resultado não pode ser relatado neste espécime porque havia ADN de quantidade insuficiente ou qualidade para análise".
8.1.2. Os primers *FLT3* ITD Master Mix são rotulados com fam (azul) e HEX (verde), iniciador dianteiro e reverso, respectivamente. Selvagem (327 pb) e picos mutantes (qualquer pico > 330 pb) deve conter tanto azul e um pico verde correspondente para ser considerado um pico real.
8.1.3. Os primers *FLT3* TKD Master Mix são rotulados apenas com fam. Um resultado positivo de *FLT3* TKD consiste em um pico do mutante que seja > 1% do pico do selvagem.

- Para calcular esse valor, divida a altura de pico do mutante (124 pb ou 127 pb para amostras de pacientes e 124 pb para o controle positivo) pela altura máxima do selvagem (79 pb).
- Um resultado negativo terá um pico mutante que é < 1,0% do pico do selvagem.

8.1.4. Todos os controlos do ensaio devem ser examinados antes da interpretação dos resultados da amostra. Se os controles não produzem os resultados corretos, o ensaio não é válido e as amostras não devem ser interpretadas.

Tabela 6. O seguinte descreve a análise de cada um dos controles, e as decisões necessárias com base nos resultados.

Tipo de control	Resultado esperado	Resultado aberrante
Controle em branco para ITD de *FLT3*	Sem picos ≥ 100 URF e major que 50 pb.	Amplificação presente, repita o ensaio.
Controle negativo para ITD de *FLT3*	Pico azul e verde em 327 pb ≥ 4500 URF	Amplificação insuficiente, pico/s positivo detectado; repita o ensaio.
Controle positivo para ITD de *FLT3*	Pico azul e verde em 327 pb ≥ 4500 URF e um pico azul e verde em 357 pb ≥ 100 URF	Amplificación insuficiente, pico mutante ausente; repetir el ensayo.
Controle em branco para TKD de *FLT3*	Sin picos ≥ 100 URF y mayor de 50 pb.	Amplificação presente, repita o ensaio.
Controle negativo para TKD de *FLT3*	Pico azul a 79 pb ≥ 4500 URF.	Amplificação insuficiente, pico(s) positivo(s) detectado(s); repetir o ensaio.
Control positivo para D835 de *FLT3*	Pico azul a 79 pb ≥ 4.500 URF e um pico azul a 124 pb ≥ 1% do pico do normal.	Amplificação insuficiente, pico mutante <1,0%; repita o ensaio.
Specimen Control Size Ladder (Opcional)	Todos los picos de 96, 197, 297, 397 e 602 pb estão presentes. Porque os fragmentos menores do PCR são amplificados preferencialmente, não é incomun para que o fragmento de 600 pb tenha um sinal diminuído ou esteja faltando inteiramente. Continue com a análise.	Se não forem observados picos, repita o ensaio a menos que os testes de amostra positivos. Se apenas 1, 2, ou 3 picos forem observados, reavalie a amostra para a degradação do ADN, a menos que os testes de amostra sejam positivos.

8.2. Interpretação da Amostra

Dado que os controlos produzem resultados esperados, as amostras clínicas devem ser interpretadas da seguinte forma:

Tabela 7. Interpretación dos amostras

Mezcla maestra para *FLT3* ITD	
Positivo:	A presença de picos do mutante (FAM e HEX) ≥ 330 pb e ≥ 100 URF é relatada como: "**deteção de uma mutação de ITD do gene *FLT3***."
Negativo:	A presença do pico normal (ambos FAM e HEX) a 327 pb (≥ 4500 URF) sem picos ≥ 330 pb e ≥ 100 URF se notifica como: "**No hay evidencia de mutación ITD del gen *FLT3***".
Falha em amplificar:	Falha em produzir um pico de tipo selvagem (327 pb para FAM e HEX) de ≥ 4500 URF com amostras negativas.
Mezcla maestra para D835 de *FLT3*	
Positivo:	A presença do pico mutante de 124 pb ou 127 pb (FAM), que é ≥ 1,0% do pico do tipo selvagem de 79 pb, é relatada como: "**detecção de uma mutação TKD do gene *FLT3***."
Negativo:	A presença do selvagem-tipo pico (FAM) em 79 pb (≥ 4500 URF), com um < 1,0% do presente do mutante é relatado como: "**nenhuma evidência de uma mutação de TKD do gene *FLT3***."
Falha em amplificar:	Falha na produção de um pico de selvagem (FAM) de ≥ 4500 URF com amostras negativas.

9. Limitações do Procedimento

- Este ensaio não identifica 100% das Mutações ativadoras do *FLT3*.
- Este ensaio não pode detectar confiantemente menos de 5 pilhas positivas por 100 pilhas normais.
- Os resultados dos testes moleculares devem sempre ser interpretados no contexto de dados clínicos, histológicos e imunofenotípicos.
- Os ensaios PCR-baseados são sujeitos à interferência pela degradação do ADN ou à inibição do PCR devido ao EDTA, à heparina, e aos outros agentes.

10. Tamanho Esperado de Produtos Amplificados

10.1. Tamanho esperado dos produtos amplificados

Os tamanhos de amplicon listados foram determinados por meio de uma plataforma ABI 3500xL. Os tamanhos de amplicon observados em seu instrumento capilar específico de eletroforese podem diferir de 1 a 4 nucleotídeos (nt) daqueles listados dependendo da plataforma de detecção e da versão do software de análise utilizado. Uma vez identificado, o tamanho do amplicon conforme determinado em sua plataforma específica será consistente de executar para executar. Essa reprodutibilidade é extremamente útil quando se monitora a recorrência da doença.

Nota: "cor" indica a cor dos produtos gerados com a mistura mestra ao usar a atribuição de cor padrão em sistemas de detecção de fluorescência de ABI.

Tabela 8. Tamanho esperado de produtos amplificados para Master Mix *FLT3* ITD

Mezcla maestra	Alvo	Cor	Amostra	Tamanho do produto em nucleotides
ITD de *FLT3*	ITD	**Azul** y **verde**	Control blanco	Sem picos > 100 URF e major a 50 pb.
		Azul y **verde**	ADN de control negativo para *FLT3*	Pico azul e verde a 327 pb ≥ 4500 URF
		Azul y **verde**	Control positivo para ITD de *FLT3*	Pico azul e verde a 327 pb ≥ 4500 URF e pico azul e verde a 357 pb ≥ 100 URF
		Azul y **verde**	Amostra paciente negativa para ITD de *FLT3*	Pico azul e verde a 327 pb ≥ 4500 URF
		Azul y **verde**	Amostra paciente positiva para ITD de *FLT3*	Pico azul e verde a ≥ 330 pb ≥ 100 URF. **Nota:** O pico normal a 327 pb pode ou não estar presente.

Tabela 9. Tamaño esperado de los productos amplificados para la Mezcla de reacción para TKD de *FLT3*

Mezcla maestra	Diana	Color	Muestra	Tamaño del producto en nucleótidos[2]
D835 de *FLT3*	TKD	**Azul**	Control blanco	Sin picos ≥ 100 URF y mayor a 50 pb.
		Azul	ADN de control negativo para *FLT3*	Pico azul a 79 pb ≥ 4500 URF
		Azul	Control positivo para D835 de *FLT3*	Pico azul a 79 pb ≥ 4500 URF e un pico azul a 124 pb, pelo menos 1 % do pico normal
		Azul	Amostra paciente negativa negativa para TKD de *FLT3*	Pico azul a 79 pb ≥ 4500 URF
		Azul	Amostra paciente positiva para TKD de *FLT3*	Pico azul a 124 pb o 127 pb , pelo menos 1 % do pico normal. **Nota:** O pico normal em 79 pb pode ou não estar presente.

Nota sobre a interpretação TKD: Alguns EcoRV produto não digerido pode estar presente e detectável como um pico azul em 147 pb. Se apenas o pico de 147 pb pour detectado ou o pico de 147 pb for ≥ 1% do pico do WT, a amostra deve ser repetida iniciando na etapa de amplificação ou na etapa de digestão do EcoRV.

10.2. Dados de exemplo

Os dados mostrados abaixo foram gerados utilizando-se as misturas mestras indicadas. Os produtos amplificados foram executados em um instrumento ABI 3500xL.

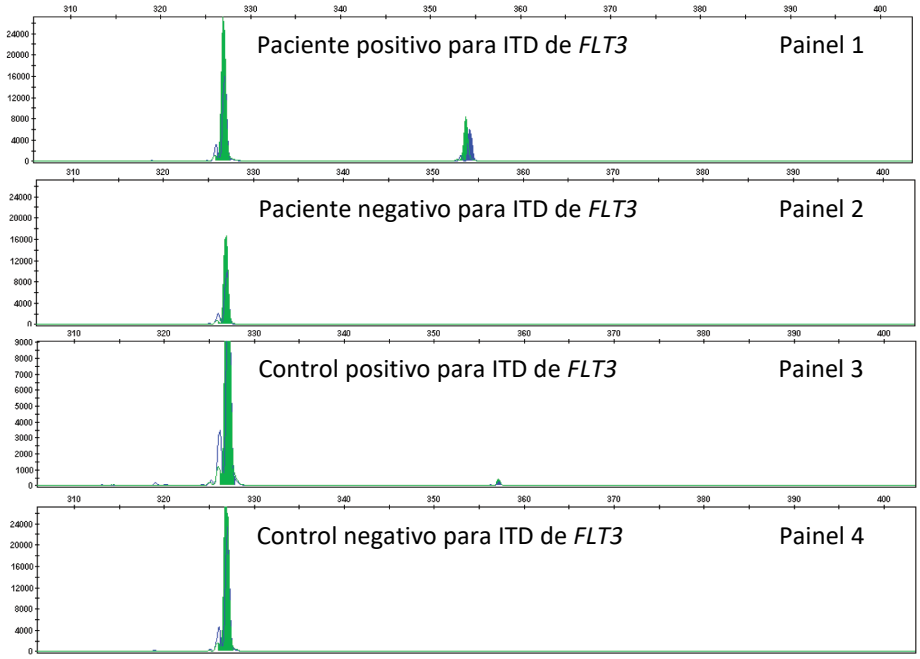


Figura 2. Para o Master Mix ITD de *FLT3* :

- O painel 1 exibe os testes gerados por dados com uma amostra paciente positiva.
- O painel 2 exibe os testes gerados por dados com uma amostra paciente negativo.
- O painel 3 exibe os testes gerados por dados com uma amostra control positivo.
- O painel 4 exibe os testes gerados por dados com uma amostra control negativo.

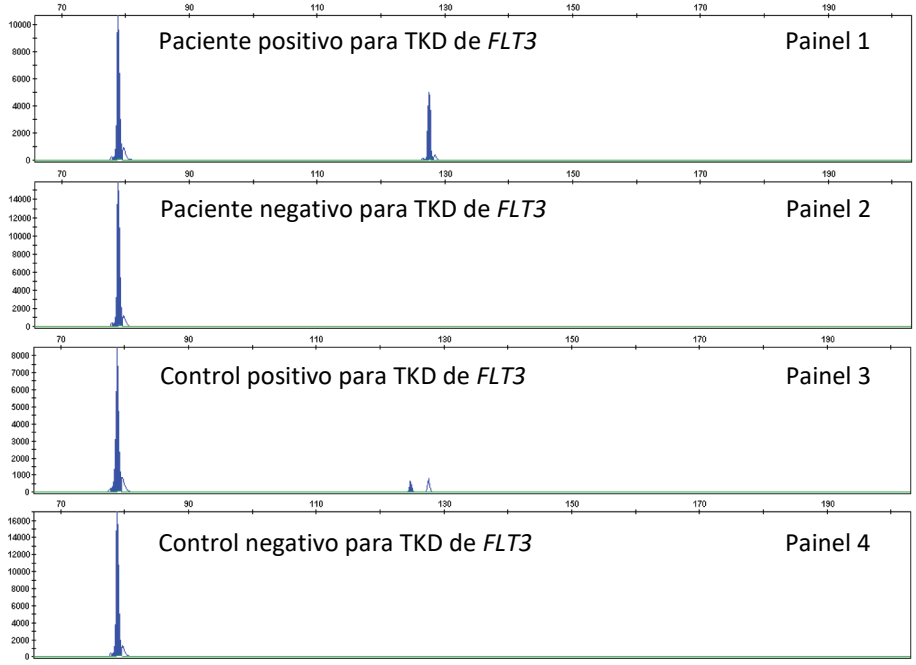


Figura 3. Para o Master Mix D835 de *FLT3*:

- O painel 1 exibe os testes gerados por dados com uma amostra paciente positiva.
- O painel 2 exibe os testes gerados por dados com uma amostra paciente negativo.
- O painel 3 exibe os testes gerados por dados com uma amostra control positivo.
- O painel 4 exibe os testes gerados por dados com uma amostra control negativo.

11. Características de Desempenho

A validação do ensaio 2,0 da mutação de LeukoStrat *FLT3* fornece a evidência que o ensaio é capaz de detectar mutações de *FLT3* ITD e de TKD com uma concordância de ⩾ 90% quando comparado a Roche®454 seqüenciamento. O estudo de validação desafiou a capacidade do ensaio de identificar mutações *FLT3* ao avaliar o impacto de múltiplos operadores, lotes de reagentes, instrumentos ABI 3500xL e dias de testes não consecutivos. O PPA e a NPA para amostras clínicas, amostras positivas inventadas, e amostras negativas artificial excederam 90% entre o 2,0 ensaio da mutação de leukostrat *FLT3* e os resultados de sequenciamento 454.

11.1. Resumo dos Datos

As amostras artificial *FLT3* ITD consistiram de um ITD positivo de 5%, de 50% de ITD positivo, e de ITD negativo. Cada amostra inventada foi testada em repetições de três usando dois lotes mestre diferentes, dois operadores diferentes, ao longo de 5 dias não consecutivos, produzindo um total de 60 repetições para cada amostra artificial. Um total de 10 amostras clínicas foram testadas em singlicate, usando duas misturas mestre diferentes, com dois operadores diferentes, ao longo de 5 dias não consecutivos, produzindo um total de 20 repetições de cada amostra clínica. Por protocolo, as execuções com controles falhados não foram incluídas nas análises finais. Um acordo de 100% e de 98% foi conseguido para as amostras inventadas e clínicas, respectivamente (refira a Tabela 10). Os controles positivo e negativo não foram incluídos nos cálculos. A amostra clínica ITD-6 foi classificada incorretamente em 4 das 20 repetições.

Tabela 10. Tamanho da amostra ITD e acordo de amostra com sequenciamento 454

Amostra	Resultado	N	% de concordância	Comentários (discrepâncias)
Pos. control	Positivo	17	100 %	N/A
5 % positivo	Positivo	51	100 %	N/A
50 % positivo	Positivo	51	100 %	N/A
ITD-1	Positivo	17	100 %	N/A
ITD-3	Positivo	17	100 %	N/A
ITD-4	Positivo	17	100 %	N/A
ITD-5	Positivo	17	100 %	N/A
ITD-6	Negativo	4	20 %	FAM (HEX picos 101 – 113 URF)
	Positivo	13	80 %	
ITD-7	Positivo	17	100 %	N/A
Neg. control neg.	Negativo	17	100 %	N/A
Negativo	Negativo	51	100 %	N/A
ITD-2	Negativo	17	100 %	N/A
ITD-8	Negativo	17	100 %	N/A
ITD-9	Negativo	17	100 %	N/A
ITD-10	Negativo	17	100 %	N/A

As amostras inventadas de *FLT3* TKD consistiram em 5% de TKD positiva, 50% de TKD positiva e TKD negativa. Cada amostra inventada foi testada em réplicas de três usando diferentes misturas, dois operadores diferentes, ao longo de 5 dias não consecutivos, produzindo um total de 60 réplicas para cada amostra planejada. Um total de 10 amostras clínicas foram testadas em singlicate, usando duas misturas mestre diferentes, com dois operadores diferentes, ao longo de 5 dias não consecutivos, produzindo um total de 20 repetições para cada amostra clínica. Uma concordância de 100% foi alcançada para amostras planejadas e clínicas (consulte a Tabela 11). Os controles Positivo e Negativo não foram incluídos nos cálculos. Um sinal artificial TKD negativo tem mais de 60 repetições que não puderam ser amplificadas o suficiente, portanto, excluídas do conjunto de análise NPA.

Tabela 11. Tamanho da amostra TKD e acordo de amostra com sequenciamento 454

Amostra	Resultado	N	% de concordância	Comentários (discrepâncias)
Pos. control	Positivo	20	100 %	N/A
5 % positivo	Positivo	60	100 %	N/A
50 % positivo	Positivo	60	100 %	N/A
TKD-2	Positivo	20	100 %	N/A
TKD-3	Positivo	20	100 %	N/A
TKD-4	Positivo	20	100 %	N/A
TKD-6	Positivo	20	100 %	N/A
TKD-7	Positivo	20	100 %	N/A
TKD-10	Positivo	20	100 %	N/A
Neg. control	Negativo	20	100 %	N/A
Negativo	Negativo	57	100 %	3/60 (5 %) não amplificar suficientemente
TKD-1	Negativo	20	100 %	N/A
TKD-5	Negativo	20	100 %	N/A
TKD-8	Negativo	20	100 %	N/A
TKD-9	Negativo	20	100 %	N/A

11.2. Análise dos Datos

Para amostras negativas conhecidas de *FLT3* ITD, houve zero resultados discordantes obtidos (119/119 concordância), produzindo uma NPA de 100% (vide tabela 12).

For *FLT3* ITD known positive samples there were 4 discordant results obtained (200/204 concordance), producing a PPA of 98.0% (refer to Table 12). A amostra clínica ITD-6 era um positivo conhecido para *FLT3* ITD por o sequenciamento 454, porém quatro das 20 repetições testadas usando o ensaio da mutação de LeukoStrat *FLT3* 2,0 retornaram resultados negativos.

Tabela 12. Acordo de porcentagem de ITD com sequenciamento 454

Acordo de porcentagem		N.º de Discordância	N.º de Concordância	*95 % LL
NPA	100 %	0	119	96,9 %
PPA	98,0 %	4	200	95,1 %

* 95% dos resultados seriam esperados para concordar com sequenciamento a uma taxa maior ou igual ao limite inferior (LL).

Para as amostras negativas conhecidas de *FLT3* TKD, houve zero resultados discordantes obtidos (137/137), produzindo uma NPA de 100% (consulte a Tabela 13) entre os resultados de 454 e o ensaio de mutação LeukoStrat *FLT3* 2,0.

Para as amostras positivas conhecidas de *FLT3* TKD, foram obtidos resultados discordantes nulos (240/240), produzindo um PPA de 100% (consulte a Tabela 13) entre os resultados de 454 e o ensaio de mutação LeukoStrat *FLT3* 2,0.

Tabela 13. Acordo de porcentagem de TKD com sequenciamento 454

Acordo de porcentagem		N.º de Discordância	N.º de Concordância	*95 % LI
NPA	100 %	0	137	96,9 %
PPA	100 %	0	240	98,5 %

* 95% dos resultados seriam esperados para concordar com sequenciamento a uma taxa maior ou igual ao limite inferior (LL).

A taxa de aceitabilidade geral de execução para *FLT3* ITD e *FLT3* TKD foi de 85% e 100%, respectivamente. As taxas de validade de amostra individual para ITD e TKD foram de 85% e 99,2%, respectivamente.

11.3. Conclusão

Esta validação fornece evidência de evidência de que o LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 é capaz de detectar mutações *FLT3* ITD e *FLT3* TKD com uma concordância mínima de 90% quando comparado ao 454 Sequenciamento.

12. Referências

1. 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.
2. Yamamoto, Y. et al., (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. Blood 97, 2434-2439.

13. Técnico e Atendimento ao Cliente

Informações para Contacto

Invivoscribe, Inc

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

Telefone: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horário de funcionamento: 9:00 – 17:00 GMT - 8/GMT - 7

Serviços Técnicos: support@invivoscribe.com | Apoio ao Cliente: sales@invivoscribe.com | Website: www.invivoscribe.com

Os representantes de serviços técnicos e de atendimento ao cliente estão disponíveis de segunda a sexta para atender perguntas de telefone, e-mail ou site.

14. Símbolos

Os símbolos a seguir são usados na rotulagem de produtos de diagnóstico Invivoscribe.

REF	Referência do catálogo		Data de validade
VOL	Volume de reagente	EC REP	Representante autorizado na União Europeia
LOT	Número de lote		Consulte as instruções de utilização
	Condições de armazenamento	IVD	Para utilização em diagnóstico *in vitro*
UDI	Identificador de Dispositivo Exclusivo		Fabricante
UK CA	Conformidade do Reino Unido Avaliada	UKRP	Pessoa responsável no Reino Unido
CH REP	Representante Autorizado Suíço	CE	Conformidade Europeia

15. Aviso Legal

Este produto é um produto de diagnóstico in vitro; não está disponível para venda ou uso na América do Norte.

15.1. Garantia e Responsabilidade

A Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) está comprometida em fornecer produtos da mais alta qualidade. A Invivoscribe® garante que os produtos atendem ou excedem os padrões de desempenho descritos nas Instruções de Uso, quanto aos produtos com tal encarte. Se um produto estiver coberto pelas especificações do produto e não funcionar conforme especificado, nossa política é substituir o produto ou creditar o preço total da compra. Nenhuma outra garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, é fornecida pela Invivoscribe®. A responsabilidade do Invivoscribe® não deve exceder o preço de compra do produto. A Invivoscribe não terá nenhuma responsabilidade por danos diretos, indiretos, consequenciais ou incidentais decorrentes do uso, resultados do uso ou incapacidade de usar seus produtos; a eficácia do produto sob condições controladas pelo comprador no laboratório do comprador deve ser estabelecida e monitorada continuamente por meio de processos definidos e controlados pelo comprador, incluindo, mas não limitado a, testes de controles positivos, negativos e brancos validados internamente toda vez que uma amostra é testada. O pedido, a aceitação e o uso do produto constituem a aceitação da responsabilidade exclusiva do comprador por garantir a eficácia do produto e o acordo do comprador com a limitação de responsabilidade estabelecida neste parágrafo.

15.2. Patentes e marcas registradas

Muitos desses produtos requerem métodos de amplificação de ácidos nucleicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Nenhuma licença sob essas patentes para usar processos de amplificação ou enzimas é transmitida expressamente ou por implicação ao comprador pela compra deste produto.

©2023 Invivoscribe, Inc. Todos os direitos reservados. As marcas registradas aqui mencionadas são de propriedade da Invivoscribe, Inc. e/ou de suas afiliadas, ou (como as marcas registradas de outros aqui usadas) de seus respectivos proprietários.