

Instrucciones de uso



## LeukoStrat® *FLT3* Mutation Assay 2.0

Para la identificación de mutaciones por duplicación en tándem interna (ITD) de la tirosina cinasa 3 relacionada con FMS (*FLT3*) y mutaciones del dominio tirosina cinasa (TKD).

**IVD** Para uso diagnóstico *in vitro*.



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

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

**N.º de catálogo**

**REF** 94120091

**Productos**

LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection

**Cantidad**

33 reacciones

# Índice

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1.</b>  | <b>USO PREVISTO .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.</b>  | <b>RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO .....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1.       | Antecedentes .....  | 3         |
| 2.2.       | Resumen .....   | 3         |
| <b>3.</b>  | <b>PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO .....</b>   | <b>3</b>  |
| 3.1.       | Mutaciones por duplicación interna en tándem (ITD) de <i>FLT3</i> .....                         | 3         |
| 3.2.       | Mutaciones del dominio tirosina quinasa (TKD) de <i>FLT3</i> .....                              | 3         |
| 3.3.       | Detección mediante fluorescencia diferencial .....  | 4         |
| <b>4.</b>  | <b>REACTIVOS .....</b>  | <b>5</b>  |
| 4.1.       | Componentes.....  | 5         |
| 4.2.       | Advertencias y precauciones .....   | 6         |
| 4.3.       | Almacenamiento y manipulación .....   | 6         |
| <b>5.</b>  | <b>INSTRUMENTAL .....</b>   | <b>7</b>  |
| 5.1.       | Termociclador.....  | 7         |
| 5.2.       | ABI 3130/3130xl o 3500/3500xL .....   | 7         |
| <b>6.</b>  | <b>RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....</b>  | <b>8</b>  |
| 6.1.       | Precauciones.....   | 8         |
| 6.2.       | Sustancias que pueden interferir.....   | 8         |
| 6.3.       | Requisitos y manipulación de las muestras.....  | 8         |
| 6.4.       | Preparación de la muestra .....   | 8         |
| 6.5.       | Almacenamiento de la muestra.....   | 8         |
| <b>7.</b>  | <b>PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .....</b>  | <b>9</b>  |
| 7.1.       | Materiales suministrados.....   | 9         |
| 7.2.       | Materiales necesarios no suministrados.....   | 9         |
| 7.3.       | Preparación de los reactivos.....   | 10        |
| 7.4.       | Amplificación.....  | 11        |
| 7.5.       | Digestión con enzimas de restricción solo para la Mezcla maestra para D835 de <i>FLT3</i> ..... | 11        |
| 7.6.       | Detección por fluorescencia ABI .....   | 12        |
| 7.7.       | Control de calidad .....  | 12        |
| <b>8.</b>  | <b>INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>   | <b>13</b> |
| 8.1.       | Análisis .....  | 13        |
| 8.2.       | Interpretación de la muestra .....  | 14        |
| <b>9.</b>  | <b>LIMITACIONES DE PROCEDIMIENTO .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>10.</b> | <b>TAMAÑO ESPERADO DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS .....</b>                                      | <b>14</b> |
| 10.1.      | Tamaño esperado de los productos amplificados.....  | 14        |
| 10.2.      | Datos de muestras.....  | 15        |
| <b>11.</b> | <b>CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO .....</b>   | <b>16</b> |
| 11.1.      | Resumen de los datos.....   | 16        |
| 11.2.      | Análisis de los datos.....  | 18        |
| 11.3.      | Conclusión.....   | 18        |
| <b>12.</b> | <b>REFERENCIAS.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>13.</b> | <b>SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>14.</b> | <b>SÍMBOLOS .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>15.</b> | <b>AVISO LEGAL.....</b>   | <b>19</b> |
| 15.1.      | Garantía y Responsabilidad.....   | 19        |
| 15.2.      | Patentes y Marcas.....  | 19        |

## 1. Uso previsto

El LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la detección mediante PCR de mutaciones activadoras de *FLT3* en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA).

Concretamente, el LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 se puede utilizar para:

- Identificar duplicaciones internas en tándem (ITD) en el gen *FLT3*
- Identificar mutaciones del dominio tirosina quinasa (TKD) en el gen *FLT3*

## 2. Resumen y explicación del ensayo

### 2.1. Antecedentes

Por lo general, la leucemia mieloide aguda (LMA) tiene un mal pronóstico. La evaluación del estado de mutación del gen del receptor *FLT3* (tirosina quinasa 3 relacionada con FMS) en la LMA con cariotipo normal es el indicador pronóstico más importante del desenlace de la enfermedad que, con frecuencia es considerable, ya que muchos estudios sobre LMA han demostrado que la presencia de mutaciones activadoras de *FLT3* se relaciona con un mal pronóstico.<sup>1,2</sup> Por este motivo, el análisis de la mutación activadora de *FLT3* es necesario para estratificar la enfermedad y determinar las opciones de tratamiento apropiadas. Este ensayo LeukoStrat mediante PCR está dirigido a las regiones del gen *FLT3* para identificar mutaciones por duplicación interna en tándem (ITD) y mutaciones del dominio tirosina quinasa (TKD), como la D835 e I836.

### 2.2. Resumen

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

Este kit de ensayo incluye 2 mezclas de reacción: la Mezcla de reacción para ITD de *FLT3* para la detección de mutaciones por duplicación interna en tándem i, y la Mezcla de reacción para D835 de *FLT3* para la detección de mutaciones en la región TKD (como las mutaciones D835 e I836).

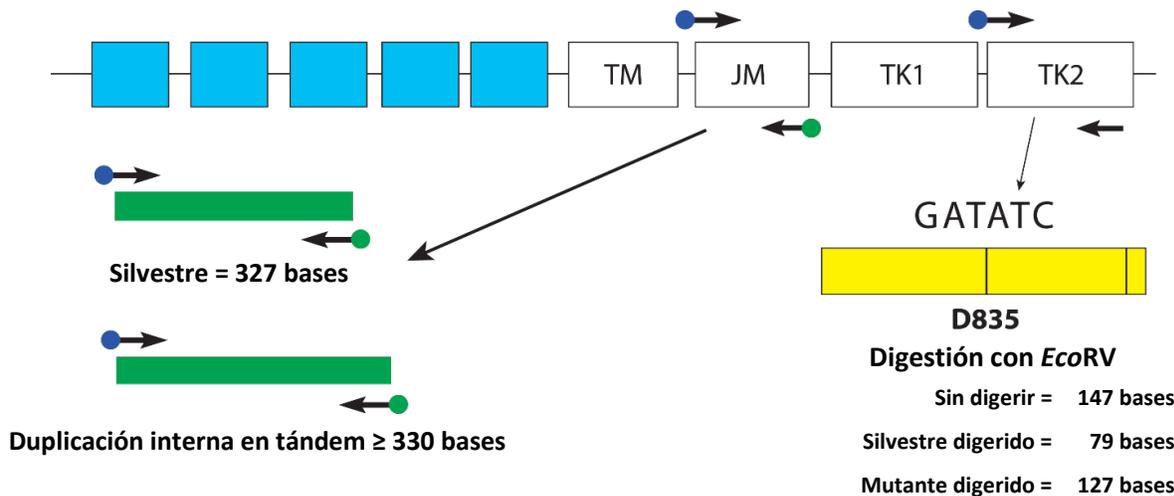
## 3. Principios del procedimiento

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

La duplicación interna en tándem de *FLT3* o mutaciones de longitud están causadas por la duplicación e inserción de una parte del gen *FLT3* que incluye la región en y alrededor de la región yuxtamembrana (JM) del gen *FLT3*. Estas mutaciones varían tanto en localización como en longitud de la secuencia de ADN duplicada insertada. Las mutaciones ITD dan lugar a la autofosforilación y activación constitutiva de *FLT3*.<sup>1</sup> Con este ensayo, los alelos normales (wild-type) de *FLT3* se amplificarán y producirán un producto de 327 pares de bases (pb), mientras que los alelos que contienen mutaciones ITD darán lugar a un producto  $\geq 330$  pb.

### 3.2. Mutaciones del dominio tirosina quinasa (TKD) de *FLT3*

Las mutaciones del dominio tirosina quinasa (TKD) de *FLT3* están causadas por sustituciones en ácidos nucleicos que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos en este centro catalítico altamente conservado. Las mutaciones TKD, como la D835 e I836, dan lugar a la autofosforilación y activación constitutiva de *FLT3*.<sup>2</sup> Los alelos normales del gen *FLT3* incluyen un sitio de digestión con la enzima de restricción EcoRV. Cuando se produce una sustitución en el ácido nucleico, desaparece el sitio de reconocimiento para la digestión con la enzima de restricción, y la endonucleasa EcoRV no es capaz de identificar y digerir el ADN en este sitio. Nuestros ensayos utilizan cebadores que se sitúan a cada lado de la región TKD. La región diana *FLT3* se amplifica mediante PCR y luego se realiza la digestión con la enzima de restricción EcoRV. Uno de los cebadores de la PCR contiene un sitio de restricción para EcoRV, de modo que se digiere tanto el alelo normal como el mutado. El patrón de digestión identifica la pérdida de la secuencia génica normal y garantiza que se ha producido la digestión. Los alelos normales del gen *FLT3* dan lugar a productos de 79 pb y los alelos mutantes dan lugar a productos de 124 pb o 127 pb. Los amplicones no digeridos son de 147 pb (longitudes de producto que corresponden a los resultados obtenidos utilizando GeneScan™ - 600™ LIZ Size Standard v2.0 y el instrumento ABI3500xL. El uso de diferentes instrumentos y patrones de tamaño puede dar lugar a diferentes tamaños de producto).



**Figura 1.** Se representa la región JM de *FLT3* y el bucle de activación del dominio quinasa. Los puntos verdes y azules con flechas negras representan las posiciones relativas de los cebadores dirigidos a la región JM para ITD y el punto azul y flechas negras restantes representan las posiciones relativas de los cebadores dirigidos a las mutaciones TKD en el bucle de activación del dominio quinasa. El cuadro amarillo tiene líneas verticales negras que representan la posición de los sitios de digestión con la enzima de restricción *EcoRV* de la secuencia normal.

### 3.3. Detección mediante fluorescencia diferencial

La detección mediante fluorescencia diferencial se suele utilizar para resolver los productos amplificados de diferentes tamaños utilizando un instrumento de electroforesis capilar. Los cebadores pueden ser marcados con diferentes moléculas fluorescentes (fluoróforos) de modo que puedan producir diferentes espectros de emisión tras su excitación con un láser en el instrumento de electroforesis capilar. De este modo, diferentes marcadores fluorescentes pueden corresponder a diferentes regiones de interés. Este sistema de detección da lugar a una alta sensibilidad, resolución de un solo nucleótido, detección diferencial de los productos y cuantificación relativa. Asimismo, se evita el uso de geles de agarosa y poliacrilamida, así como el uso de carcinógenos, como el bromuro de etidio, que puede quedar prácticamente eliminado. Además, la detección diferencial permite una interpretación exacta, reproducible y objetiva de los productos específicos y el archivo automático de los datos. La reproducibilidad inter e intraensayo en la determinación del tamaño mediante electroforesis capilar es de aproximadamente 1 a 2 nucleótidos. Esta reproducibilidad y sensibilidad junto con el archivo automático de los datos de la muestra permite la supervisión, el seguimiento y la comparación de los datos de pacientes individuales a lo largo del tiempo.

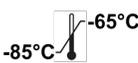
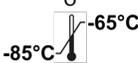
## 4. Reactivos

### 4.1. Componentes

**Tabla 1.** Kits disponibles

| Número de catálogo  | Descripción  | Reacciones totales |
|---------------------|--|--------------------|
| <b>REF</b> 94120091 | LeukoStrat <i>FLT3</i> Mutation Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection | 33                 |

**Tabla 2.** Componentes del LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 kit

| Reactivo                                | Número de catálogo | Componentes de los reactivos (principios activos)  | Cantidad unitaria | Número de unidades | Temp. de conservación   |
|---|--------------------|--|-------------------|--------------------|---|
| <b>Mezcla de reacción</b>               | 24120011CE         | <b>Mezcla de reacción para ITD de <i>FLT3</i> – 6FAM y HEX</b><br>Múltiples oligonucleótidos dirigidos al gen <i>FLT3</i> en una solución salina tamponada.        | 1500 µl           | 1                  |    |
|   | 24120031CE         | <b>Mezcla de reacción para D835 de <i>FLT3</i> – 6FAM</b><br>Múltiples oligonucleótidos dirigidos a la región TKD de <i>FLT3</i> en una solución salina tamponada. | 1500 µl           | 1                  |   |
| <b>ADN de control positivo</b>          | 40883390           | <b>Control positivo para ITD de <i>FLT3</i></b><br>50 µg/ml de ADN en solución TE 1/10   | 100 µl            | 1                  |  |
|   | 40883400           | <b>Control positivo para D835 de <i>FLT3</i></b><br>50 µg/ml de ADN plasmídico en solución TE 1/10   | 100 µl            | 1                  |   |
| <b>ADN de control negativo (normal)</b> | 40920030           | <b>Control negativo de <i>FLT3</i></b><br>50 µg/ml de ADN en solución TE 1/10  | 100 µl            | 1                  |  |

## 4.2. Advertencias y precauciones

### ¡IMPORTANTE!

Lea atentamente las instrucciones de uso antes de comenzar el procedimiento de ensayo y siga cada paso atentamente.

- **IVD** Producto para uso de diagnóstico *in vitro*.
- El kit de ensayo debe usarse como un sistema. No utilice los reactivos de otros fabricantes. La dilución, la reducción de los volúmenes de las reacciones de amplificación u otras desviaciones de este protocolo pueden afectar el rendimiento de esta prueba y/o anular cualquier sublicencia limitada que se obtenga con la compra de este kit de análisis.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad marcada cuando se almacenan y manejan según las instrucciones. No utilice los kits después de su fecha de caducidad.
- El cumplimiento preciso del protocolo garantizará un rendimiento y una reproducibilidad óptimos. Se debe tener cuidado para garantizar el uso del programa correcto del termociclador, ya que otros programas pueden proporcionar datos inexactos/defectuosos, como resultados falsos positivos y falsos negativos.
- Utilice solamente EcoRV para la digestión con enzimas de restricción, pues el uso de la enzima de restricción incorrecta puede dar lugar a resultados falsos positivos o falsos negativos.
- No mezcle ni combine reactivos de kits con diferentes números de lote.
- Todos los procedimientos de laboratorio deben realizarse con equipo de protección personal estándar (guantes, batas de laboratorio y gafas protectoras). El personal de laboratorio debe seguir buenas prácticas de laboratorio y precauciones universales cuando trabaje con muestras. Las muestras deben manipularse en instalaciones aprobadas de contención de seguridad biológica y abrirse solo en campanas de seguridad biológica certificadas.
- Se recomienda usar agua de grado de biología molecular con la preparación del ADN de la muestra.
- Debido a la sensibilidad analítica de esta prueba, se debe tener extremo cuidado para evitar la contaminación de reactivos o mezclas de amplificación con muestras, controles o materiales amplificados. Todos los reactivos deben controlarse con atención para detectar signos de contaminación (por ejemplo, controles negativos que den señales positivas). Deseche los reactivos sospechosos de contaminación.
- Para minimizar la contaminación, use guantes limpios cuando manipule muestras y reactivos, y limpie de manera regular las zonas de trabajo y las pipetas antes de realizar la PCR.
- La secuencia de trabajo en el laboratorio de PCR debe ser unidireccional entre zonas de trabajo: zona de preparación de mezclas de reacción, zona de preparación de muestras, zona de amplificación y zona de detección. El proceso de esterilización con autoclave no elimina la contaminación del ADN. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para la preparación de mezclas de reacción y muestras. Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica deben ser de uso exclusivo de dicha zona.
- Los artículos no desechables deben descontaminarse en lejía al 10 % y enjuagarse con agua destilada dos veces por separado antes de devolverlos a las áreas de trabajo. Se debe usar material plástico estéril y desechable siempre que sea posible para evitar la contaminación.

## 4.3. Almacenamiento y manipulación

- Si el producto no es usado de forma inmediata los kits se deben conservar a una temperatura de entre **-85 °C y -65 °C**.
- La temperatura de conservación óptima para los controles de ADN es entre 2°C y 8°C, aunque los controles de ADN se pueden conservar a entre -85 °C y -65 °C.
- Tanto los reactivos como los controles deben descongelarse y mezclarse en un agitador antes de usarse para garantizar que se han resuspendido completamente. La agitación excesiva puede dañar el ADN y hacer que los cebadores marcados pierdan sus fluoróforos.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad marcada cuando se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits pasada su fecha de caducidad.
- Debido a las altas concentraciones de sal, las mezclas de reacción de PCR son sensibles a los ciclos de congelación/descongelación. En caso necesario, alicuote las mezclas de reacción en tubos estériles de rosca estériles y herméticos con tapa de rosca

## 5. Instrumental

### 5.1. Termociclador

- Uso o función: Amplificación de muestras de ADN
- Instrumento sugerido: Veriti™ Dx Thermal Cycler o equivalente
- Rendimiento y características técnicas:
  - Rango térmico mínimo: 15°C a 96°C
  - Velocidad de aceleración mínima: 0,8°C/s
- Siga los procedimientos de instalación, operación, calibración y mantenimiento del fabricante.
- Véase el apartado 7.4 *Amplificación*, para conocer el programa del termociclador.

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

- Uso o función: Detección y análisis de fragmentos
- Características técnicas y de rendimiento:
- Los siguientes instrumentos de electroforesis capilar cumplen las necesidades de rendimiento de este ensayo:
  - ABI 3130 Genetic Analyzer\* (4 capilares)
  - ABI 3130xl Genetic Analyzer\* (16 capilares)
  - ABI 3500 Genetic Analyzer\* (8 capilares)
  - ABI 3500xL Genetic Analyzer\* (24 capilares)
- Siga los procedimientos de instalación, operación, calibración y mantenimiento del fabricante.
- Los analizadores genéticos se deben calibrar con el DS-33 Matrix Standard para el Dye Set G5 (recomendado). Con la serie 3130 se puede utilizar El DS-30 Matrix Standard para el Dye Set D (opción alternativa).
- Utilice los ajustes por defecto de su tipo de polímero y capilar.
- Para la preparación de muestras Véase el apartado 7.6 *Detección por fluorescencia ABI*.

**\*Advertencia:** Estos productos no contienen el marcado CE.

## 6. Recogida y preparación de las muestras

### 6.1. Precauciones

Las muestras biológicas humanas pueden contener materiales potencialmente infecciosos. Las muestras deben manipularse de acuerdo con el programa sobre patógenos de transmisión hemática de su centro y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.

### 6.2. Sustancias que pueden interferir

Se sabe que las siguientes sustancias interfieren con la reacción de PCR:

- Quelantes de cationes divalentes
- Puntas de pipeta de baja retención
- EDTA (no significativo en bajas concentraciones)
- Heparina
- Células suspendidas en un fijador, como ácido acético, B5, etc.

### 6.3. Requisitos y manipulación de las muestras

Este ensayo analiza ADN genómico a partir de las siguientes fuentes:

- Aspirado de sangre periférica o de médula ósea anticoagulado con heparina, EDTA, ACD o células mononucleares previamente aisladas frescas en un medio apropiado (RPMI o similar) o congeladas en un medio de crioconservación apropiado.
- La sangre periférica y los aspirados de médula ósea se pueden conservar a entre 2 °C y 8 °C durante 7 días y seguir dando resultados válidos. Las células mononucleares aisladas se pueden conservar frescas durante un máximo de 7 días o de manera indefinida si se criopreservan de forma adecuada.
- 500 ng de ADN genómico (conservado entre 2°C y 8°C o por debajo de -15°C y enviado a temperatura ambiente, refrigerado o en hielo seco).

### 6.4. Preparación de la muestra

Extraer el ADN genómico a partir de las muestras de los pacientes lo antes posible. Las muestras de ADN deben ser estandarizadas a una concentración final de 50 µg/ml.

### 6.5. Almacenamiento de la muestra

El ADN genómico se debe conservar a entre 2°C y 8°C o por debajo de -15°C.

## 7. Procedimiento de ensayo

### 7.1. Materiales suministrados

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

### 7.2. Materiales necesarios no suministrados

**Tabla 3.** Materiales necesarios no suministrados

| Reactivo/Material  | Reactivos recomendados/Materiales y proveedores   | Número de catálogo                     | Notas  |
|--|---|--|--|
| <b>ADN polimerasa</b>  | Roche®:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>ADN polimerasa EagleTaq™</li> </ul> Invivoscribe, Inc.:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>FalconTaq DNA Polymerase o equivalente</li> </ul>   | 05206944190<br><br>60970130            | N/C  |
| <b>Agua grado USP o agua de grado biología molecular desionizada y destilada en vidrio</b> | N/C   | N/C                                    | El agua debe ser estéril y estar libre de DNasa y RNasa.                 |
| <b>Pipetas calibradas</b>  | BIOHIT:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>Proline®</li> <li>eLine®</li> </ul> Rainin:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>Pipetas P-2, P-20, P-200 y P-1000 o</li> <li>Pipetas SL-2, SL-20, SL-200 y SL-1000</li> </ul>   | N/C                                    | Debe ser capaz de medir con precisión volúmenes de entre 1 µl y 1000 µl. |
| <b>Termociclador</b>   | Life Technologies:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>Veriti™ Dx Thermal Cycler</li> </ul>   | 4452300                                | N/C  |
| <b>Endonucleasa EcoRV</b>  | New England Biolabs<br><ul style="list-style-type: none"> <li>EcoRV 20.000 unidades/ml</li> </ul>   | R0195S o R0195L                        | N/C  |
| <b>NEBuffer 3.1</b>  | New England Biolabs<br><ul style="list-style-type: none"> <li>NEBuffer 3.1</li> </ul>   | B7203S                                 | Incluido con la enzima de restricción EcoRV                              |
| <b>Agitador</b>  | N/C   | N/C                                    | N/C  |
| <b>Placas o tubos para PCR</b>   | N/C   | N/C                                    | Estéril  |
| <b>Puntas de pipeta con filtro</b>   | N/C   | N/C                                    | Estéril, RNasa / DNasa / libres de pirógenos                             |
| <b>Tubos para microcentrífuga</b>  | N/C   | N/C                                    | Estéril  |
| <b>Instrumento de electroforesis capilar ABI</b>   | Applied Biosystems®:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>Serie ABI 3130 Genetic Analyzer</li> <li>Serie ABI 3500 Genetic Analyzer</li> </ul>  | 313001R o 3130XLR<br>4406017 o 4406016 | N/C  |
| <b>Formamida Hi-Di</b>   | Applied Biosystems:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>Formamida™ Hi-Di</li> </ul>   | 4440753                                | N/C  |
| <b>Standares de tamaño</b>   | Applied Biosystems:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>Recomendado para las series ABI 3130 y ABI 3500:<br/> <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan™ 600™ LIZ® dye Size Standard v2.0</li> </ul> </li> <li>Alternativamente para la serie ABI 3130:<br/> <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan™ - 400HD ROX™ dye Size Standard</li> </ul> </li> </ul> | 4408399<br><br>402985 o 4310366        | N/C  |

Tabla 3. Materiales necesarios no suministrados

| Reactivo/Material                          | Reactivos recomendados/Materiales y proveedores   | Número de catálogo                                 | Notas |
|--|---|--|-------|
| <b>Spectral Calibration Dye Set D o G5</b> | Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Recomendado para las series ABI 3130 y ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)</li> </ul> </li> <li>Opción alternativa para la serie ABI 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D)</li> </ul> </li> </ul> | 4345833<br>4345827                                 | N/C   |
| <b>Polímero</b>                            | Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Polímero POP-7: <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7™ para la serie 3130</li> <li>POP-7™ para la serie 3500</li> </ul> </li> </ul>   | 4352759 o 4363785<br>4393708 o 4393714<br>o A26073 | N/C   |
| <b>Solución tampón</b>                     | Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Para la serie ABI 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>310 and 31xx Running Buffer, 10x</li> </ul> </li> <li>Para la serie ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> <li>Anode Buffer Container 3500 Series</li> <li>Cathode Buffer Container 3500 Series</li> </ul> </li> </ul>        | 402824<br>4393927<br>4408256                       | N/C   |
| <b>Lámina de aluminio de 96 pocillos</b>   | N/C   | N/C  | N/C   |
| <b>Tiras de 96 pocillos y 8 tapas</b>      | N/C   | N/C  | N/C   |

### 7.3. Preparación de los reactivos

Los controles positivos, negativos y blanco se deben analizar para cada una de las mezclas de reacción.

**Opcional:** todas las muestras desconocidas se pueden analizar utilizando la Specimen Control Size Ladder Master Mix. Esto permite garantizar que no hay inhibidores de la amplificación presentes y que hay ADN en cantidad y de calidad suficiente para generar un resultado válido. La Specimen Control Size Ladder Master Mix se puede adquirir de manera separada a Invivoscribe (N.º de cat.: 20960021 para la detección por ABI).

#### Meclas de amplificación

- 7.3.1. Limpiar la campana con lejía al 10 %, aclarar con de agua y a continuación con etanol al 70 %.
- 7.3.2. Usando guantes retirar las mezclas de reacción del congelador. Dejar que los tubos se descongelen por completo (evite la exposición directa a la luz); a continuación, mezclar suavemente con el agitador o invertir el tubo entre 5 y 10 veces para mezclar bien.
- 7.3.3. En la campana de contención retirar una alícuota adecuada de cada mezcla de reacción a los tubos de microcentrífuga individuales, estériles y limpios.
- Los volúmenes de las alícuotas deben ser de 45 µl para cada reacción.
  - Recomendamos añadir una reacción adicional por cada 15 reacciones para compensar errores de pipeteo.
  - Por tanto, para cada mezcla de reacción, el número de reacciones (n) debe ser:

|            |                                  |   |
|------------|----------------------------------|---|
| <b>n =</b> | <b>1 × n.º de muestras</b>       |   |
|            | + 1                              | ADN de control positivo ( <b>control positivo de FLT3</b> ) |
|            | + 1                              | ADN de control negativo ( <b>control negativo de FLT3</b> ) |
|            | + 1                              | control blanco (agua)                                       |
|            | + 1                              | para compensar errores de pipeteo                           |
| <b>n =</b> | <b>n.º de muestras + 4 Total</b> |   |
  - Por tanto, el volumen total de la alícuota para cada mezcla de reacción debe ser de **n × 45µl**.
- 7.3.4. Añadir 1,25 unidades (o 0,25 µl a 5 unidades/µl) de ADN polimerasa por reacción a cada mezcla de reacción.
- La ADN polimerasa total añadida a cada mezcla maestra debe ser **n × 0,25 µl**.
  - Invertir el tubo varias veces para mezclar bien.

- 7.3.5. Para cada reacción, alicuotar 45 µl de la mezcla de reacción apropiada + solución de ADN polimerasa en los pocillos individuales en una placa de PCR o en un tubo.
- 7.3.6. Añadir 5 µl de la muestra correspondiente (ADN de la muestra problema a una concentración de 50 µg/ml, ADN de control positivo, ADN de control negativo, o agua) a los pocillos individuales que contienen las correspondientes soluciones de mezclas de reacción.
- Mezclar suavemente con la pipeta de 5 a 10 veces.
- 7.3.7. Tapar o cubrir la placa de PCR.
- Las muestras están listas para su amplificación en un termociclador.

**Tabla 4.** Configuración de la reacción

| Reactivo                 | Volumen         |
|--------------------------|-----------------|
| Mezcla de reacción       | 45 µl           |
| ADN polimerasa           | 0,25 µl         |
| Muestra o ADN de control | 5 µl            |
| <b>Volumen total</b>     | <b>50,25 µl</b> |

## 7.4. Amplificación

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

**Tabla 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. Extraer la placa o los tubos de amplificación del termociclador.
- Conservar los amplicones entre 2° C y 8° C hasta que estén listos para su análisis en ABI 3130/3130xL o ABI 3500/3500xL.

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

- 7.5.1. Utilizando guantes, retirar el NEBuffer 3.1 del congelador. Dejar que se descongele completamente; luego agitar suavemente para mezclar.
- 7.5.2. En la campana de contención, agregar lo siguiente a un tubo de microcentrífuga limpio y estéril individual.
- Recomendamos añadir una reacción adicional por cada 15 reacciones para compensar errores de pipeteo.
  - Por tanto, el número de reacciones (n) debe ser:

$$n = \frac{1 \times \text{n.º de muestras} + 1}{\text{n.º de muestras} + 1 \text{ Total}} \text{ para compensar errores de pipeteo}$$

- 7.5.3. Añadir 15,7 µl de agua de grado molecular por reacción al tubo.
- El volumen total de agua añadida debe ser de **n × 15,7 µl**.
- 7.5.4. Añadir 2,3 µl de NEBuffer 3.1 por reacción al tubo.
- El volumen total de NEBuffer 3.1 añadido debe ser de **n × 2,3 µl**.
- 7.5.5. Añadir 2 µl de endonucleasa EcoRV (20.000 unidades/ml) por reacción al tubo.
- El volumen total de endonucleasa EcoRV añadido debe ser de **n × 2 µl**.
  - Mezclar con suavidad con el agitador.
- 7.5.6. Para cada reacción, alicuotar 20 µl de la mezcla anterior en los pocillos individuales en una placa o tubo de PCR.

- 7.5.7. Añadir 10 µl de cada amplicón *FLT3* D835 a sus correspondientes pocillos que contienen la mezcla de digestión con la enzima de restricción.
- Pipetear arriba y abajo varias veces para mezclar.
- 7.5.8. Tapar o cubrir la placa de PCR.
- 7.5.9. Incubar a 37°C durante al menos 60 minutos y hasta 24 horas.
- Aunque el ADN amplificado es estable a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo, los productos de PCR se deben conservar a entre 2°C y 8°C hasta su detección.
  - La detección se debe realizar en los 30 días posteriores a la amplificación.

## 7.6. Detección por fluorescencia ABI

Hay que tener en cuenta de que en la detección por fluorescencia ABI se suele observar un pico precedente. Se trata de un artefacto debido al método de detección que utiliza la plataforma ABI. Los picos precedentes suelen estar sesgados y tienen bases que se inclinan en el lado derecho hacia el pico real.

**Advertencia:** No recomendamos analizar mezclas de productos de PCR de diferentes mezclas de reacción ya que dará lugar a una menor sensibilidad general del ensayo.

- 7.6.1. En un tubo de microcentrífuga nuevo, mezclar una cantidad apropiada (para un total de 10 µl por reacción de PCR) de formamida Hi-Di con 600 LIZ Size Standards v2.0. Mezclar bien con el agitador.
- 7.6.2. En una placa para PCR de 96 pocillos nueva, añadir 10 µl de formamida Hi-Di con 600 LIZ Size Standards v2.0 en los pocillos individuales para cada reacción de PCR.
- 7.6.3. Añadir 0,5 µl de cada amplicón a los pocillos que contienen formamida Hi-Di con 600 LIZ Size Standards v2.0. Añadir olamente una muestra por pocillo. Mezclar con la pipeta
- 7.6.4. Tapar la placa de PCR con una lámina de aluminio o con tiras de PCR de 8 tapas.
- 7.6.5. Desnaturalizar con calor las muestras a 95 °C durante 3 minutos y luego enfriar en hielo o a 4 °C durante 5 minutos.
- 7.6.6. Preparar una **hoja de muestras** y una **lista de inyección** para las muestras a analizar.
- 7.6.7. Correr las muestras en el instrumento de electroforesis capilar ABI de acuerdo con el manual del usuario.
- 7.6.8. Los datos se muestran automáticamente en forma de picos de tamaño y color específicos. Revisar los resultados y los controles, y notificar los resultados. (Ver los apartados 8 *Interpretación de los resultados* y 10 *Tamaño esperado de los productos amplificados* a continuación.)

## 7.7. Control de calidad

Los controles positivos y negativos (o normales) se suministran con el kit y se deben analizar cada vez que se realice el ensayo, a fin de asegurar la realización correcta del mismo. Asimismo, también se debe incluir un control sin ADN (por ejemplo, agua) para controlar una posible contaminación de la mezcla de reacción o contaminación cruzada de las reacciones de PCR debido a una técnica inadecuada. También se debe incluir un control de tampón para garantizar que no hay contaminación en la solución tampón utilizada para resuspender las muestras. Los valores de los controles positivos se proporcionan en el apartado 10 *Tamaño esperado de los productos amplificados*.

## 8. Interpretación de los resultados

Tanto los resultados positivos como negativos se deben interpretar en el contexto de toda la información clínica y de los resultados de los análisis de laboratorio. El rango de tamaños para cada una de las mezclas de reacción ha sido determinado mediante el análisis de las muestras control positivas y negativas. Para una interpretación exacta y significativa, es importante ignorar los picos que aparecen fuera del rango válido de tamaños para cada una de las mezclas de reacción.

- Hay que tener en cuenta que, de manera inherente al instrumento ABI, puede haber una variabilidad de +/-1 pb en el tamaño de cada fragmento.

### 8.1. Análisis

- 8.1.1. Las muestras que no amplifiquen tras repetir el análisis se deben reportar como “No se puede informar un resultado para esta muestra porque no se obtiene ADN en cantidad o calidad suficiente para su análisis”.
- 8.1.2. Los cebadores de la Mezcla de reacción para ITD de FLT3 están marcados con FAM (azul) y HEX (verde), cebador directo e inverso, respectivamente. Los picos normal (327 pb) y mutante (cualquier pico  $\geq 330$  pb) deben contener los correspondientes picos azul y verde para considerarse un pico real.
- 8.1.3. Los cebadores de la Mezcla de reacción para TKD de FLT3 solo están marcados con FAM. Un resultado positivo para TKD de FLT3 consiste en el pico mutante  $\geq 1$  % del pico normal.
  - Para calcular este valor, divida la altura del pico mutante (124 pb o 127 pb para las muestras del paciente y 124 pb para el control positivo) por la altura del pico normal (79 pb).
  - Un resultado negativo tendrá un pico mutante  $< 1,0$  % del pico normal
- 8.1.4. Se deben examinar todos los controles del ensayo antes de la interpretación de los resultados de las muestras. Si los controles no proporcionan los resultados correctos, el ensayo no es válido y las muestras no se deben interpretar.

**Tabla 6.** A continuación se describe el análisis de cada uno de los controles, así como las decisiones necesarias basadas en los resultados.

| Tipo de control                                   | Resultado esperado   | Resultado aberrante  |
|---|--|--|
| <b>Control sin muestra para ITD de FLT3</b>       | Sin picos $\geq 100$ URF y mayor de 50 pb.   | Amplificación presente, repetir el ensayo.   |
| <b>Control negativo para ITD de FLT3</b>          | Pico azul y verde a 327 pb $\geq 4500$ URF   | Amplificación insuficiente, pico(s) positivo(s) detectado(s); repetir el ensayo.   |
| <b>Control positivo para ITD de FLT3</b>          | Pico azul y verde a 327 pb $\geq 4500$ URF y pico azul y verde a 357 pb $\geq 100$ URF   | Amplificación insuficiente, pico mutante ausente; repetir el ensayo.   |
| <b>Control sin muestra para TKD de FLT3</b>       | Sin picos $\geq 100$ URF y mayor de 50 pb.   | Amplificación presente, repetir el ensayo.   |
| <b>Control negativo para TKD de FLT3</b>          | Pico azul a 79 pb $\geq 4500$ URF.   | Amplificación insuficiente, pico(s) positivo(s) detectado(s); repetir el ensayo.   |
| <b>Control positivo para D835 de FLT3</b>         | Pico azul a 79 pb $\geq 4500$ URF y pico azul a 124 pb $\geq 1$ % del pico normal.   | Amplificación insuficiente, pico mutante $< 1,0$ %; repetir el ensayo.   |
| <b>Specimen Control Size Ladder</b><br>(Opcional) | Todos los picos de 96, 197, 297, 397 y 602 pb están presentes.<br>Debido a que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb tenga una menor señal o que esté completamente ausente. Continúe con el análisis. | Si no se observan picos, repita el ensayo <u>a menos que la muestra ofrezca un resultado positivo.</u><br>Si solo se observan los picos 1, 2 o 3, vuelva a evaluar la muestra para comprobar la presencia de degradación del ADN, <u>a menos que la muestra proporcione un resultado positivo.</u> |

## 8.2. Interpretación de la muestra

Si los controles producen los resultados esperados, las muestras clínicas se deben interpretar del siguiente modo:

**Tabla 7.** Interpretación de las muestras

| Mezcla maestra para ITD de <i>FLT3</i>  |  |
|---|--|
| <b>Positivo:</b>                        | La presencia de picos mutantes (tanto FAM como HEX) $\geq 330$ pb y $\geq 100$ URF se notifica como: <b>"Detección de una mutación ITD del gen <i>FLT3</i>".</b>                                       |
| <b>Negativo:</b>                        | La presencia de pico normal (tanto FAM como HEX) a 327 pb ( $\geq 4500$ URF) sin picos $\geq 330$ pb y $\geq 100$ URF se notifica como: <b>"No hay evidencia de mutación ITD del gen <i>FLT3</i>".</b> |
| <b>No se puede amplificar:</b>          | Imposibilidad de producir un pico normal (327 pb para FAM y HEX) de $\geq 4500$ URF con muestras negativas.  |
| Mezcla maestra para D835 de <i>FLT3</i> |  |
| <b>Positivo:</b>                        | La presencia de pico mutante de 124 pb o 127 pb (FAM) que sea $\geq 1,0$ % del pico normal de 79 pb se notifica como: <b>"Detección de una mutación TKD del gen <i>FLT3</i>".</b>                      |
| <b>Negativo:</b>                        | La presencia de pico normal (FAM) a 79 pb ( $\geq 4500$ URF), con $< 1,0$ % del mutante presente se notifica como: <b>"Sin signos de una mutación TKD del gen <i>FLT3</i>".</b>                        |
| <b>No se puede amplificar:</b>          | Imposibilidad de producir un pico normal (FAM) de $\geq 4500$ URF con muestras negativas.  |

## 9. Limitaciones de procedimiento

- Este ensayo no identifica el 100 % de las mutaciones de activación de *FLT3*.
- Este ensayo no puede detectar de manera fiable menos del 5 por ciento de células positivas por cada 100 células normales.
- Los resultados de las pruebas moleculares siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos.
- Los ensayos basados en la técnica de PCR están sujetos a interferencias por la degradación del ADN o a la inhibición de la PCR debido a EDTA, heparina y otros compuestos.

## 10. Tamaño esperado de los productos amplificados

### 10.1. Tamaño esperado de los productos amplificados

Los tamaños del amplicón indicados se determinaron utilizando una plataforma ABI 3500xL. Los tamaños del amplicón observados en su instrumento de electroforesis capilar específico puede diferir entre 1 y 4 nucleótidos (nt) de los indicados, dependiendo de la plataforma de detección y de la versión del software de análisis utilizado. Una vez identificado, el tamaño del amplicón determinado en su plataforma específica será coherente entre una ejecución y otra. Esta reproducibilidad es extremadamente útil cuando se supervisa la recurrencia de la enfermedad.

**Nota:** "Color" indica el color de los productos generados con la mezcla de reacción se utiliza el color predeterminado en los sistemas de detección por fluorescencia ABI.

**Tabla 8.** Tamaño esperado de los productos amplificados para la Mezcla de reacción de ITD para *FLT3*

| Mezcla maestra     | Diana | Color        | Muestra   | Tamaño del producto en nucleótidos <sup>2</sup>  |
|--------------------|-------|--------------|---|--|
| ITD de <i>FLT3</i> | ITD   | Azul y verde | Control blanco  | Sin picos $> 100$ URF y mayor de 50 pb.  |
|                    |       | Azul y verde | ADN de control negativo para <i>FLT3</i>                | Pico azul y verde a 327 pb $\geq 4500$ URF   |
|                    |       | Azul y verde | Control positivo para ITD de <i>FLT3</i>                | Pico azul y verde a 327 pb $\geq 4500$ URF y pico azul y verde a 357 pb $\geq 100$ URF                               |
|                    |       | Azul y verde | Muestra del paciente negativa para ITD de <i>FLT3</i>   | Pico azul y verde a 327 pb $\geq 4500$ URF   |
|                    |       | Azul y verde | Muestras de pacientes positivas para ITD de <i>FLT3</i> | Pico azul y verde a $\geq 330$ pb $\geq 100$ URF.<br><b>Nota:</b> El pico normal a 327 pb puede estar o no presente. |

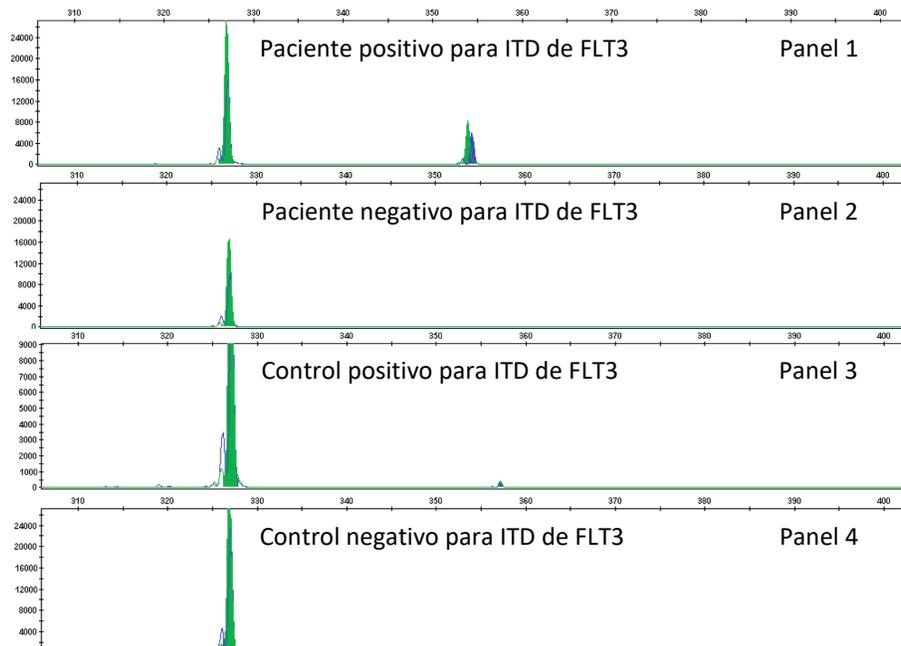
**Tabla 9.** Tamaño esperado de los productos amplificados para la Mezcla de reacción para TKD de *FLT3*

| Mezcla maestra      | Diana | Color | Muestra   | Tamaño del producto en nucleótidos <sup>2</sup>  |
|---------------------|-------|-------|---|--|
| D835 de <i>FLT3</i> | TKD   | Azul  | Control blanco  | Sin picos $\geq 100$ URF y mayor de 50 pb.   |
|                     |       | Azul  | ADN de control negativo para <i>FLT3</i>                | Pico azul a 79 pb $\geq 4500$ URF  |
|                     |       | Azul  | Control positivo para D835 de <i>FLT3</i>               | Pico azul a 79 pb $\geq 4500$ URF y un pico azul a 124 pb al menos del 1 % del pico normal   |
|                     |       | Azul  | Muestra del paciente negativa para TKD de <i>FLT3</i>   | Pico azul a 79 pb $\geq 4500$ URF  |
|                     |       | Azul  | Muestras de pacientes positivas para TKD de <i>FLT3</i> | Pico azul a 124 pb o 127 pb que es al menos del 1 % del pico normal.<br><b>Nota:</b> El pico normal a 79 pb puede estar o no presente. |

**Nota sobre la interpretación de TKD:** parte del producto sin digerir de EcoRV podría estar presente y ser detectable como un pico azul a 147 pb. Si solo se detecta el pico de 147 pb o el pico de 147 pb es  $\geq 1$  % del pico normal, la muestra se debe repetir ya sea empezando en el paso de amplificación o en el paso de digestión con EcoRV.

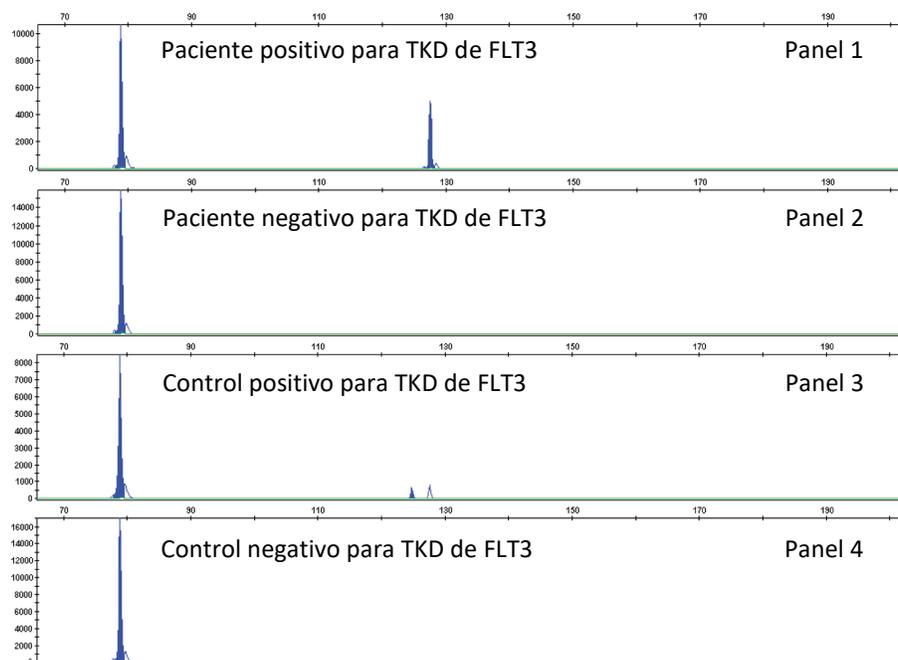
## 10.2. Datos de muestras

Los datos que se muestran a continuación se generaron utilizando las mezclas de reacción indicadas. Los productos amplificados se ejecutaron en un instrumento ABI 3500xL.



**Figura 2.** Para la Mezcla de reacción para ITD de *FLT3*:

- El panel 1 muestra los datos generados del análisis con una muestra de paciente positivo.
- El panel 2 muestra los datos generados del análisis con una muestra de paciente negativo.
- El panel 3 muestra los datos generados del análisis con la muestra de control positivo.
- El panel 4 muestra los datos generados del análisis con la muestra control negativo.



**Figura 3.** Para la Mezcla de reacción para D835 de *FLT3*:

- El panel 1 muestra los datos generados del análisis con una muestra de paciente positivo.
- El panel 2 muestra los datos generados del análisis con una muestra de paciente negativo.
- El panel 3 muestra los datos generados del análisis con la muestra de control positivo.
- El panel 4 muestra los datos generados del análisis con la muestra control negativo.

## 11. Características de rendimiento

La validación del LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 proporciona evidencia de que el ensayo es capaz de detectar mutaciones ITD y TKD de *FLT3* con una concordancia de  $\geq 90\%$  cuando se compara con la secuenciación 454 de Roche®. El estudio de validación puso a prueba la capacidad del ensayo de identificar las mutaciones de *FLT3*, al tiempo que evaluó la influencia de múltiples operadores, lotes de reactivos, instrumentos ABI 3500xL y días de ensayo no consecutivos. La concordancia porcentual positiva (PPA, por sus siglas en inglés) y la concordancia porcentual negativa (NPA) para muestras clínicas, muestras positivas artificiales y muestras negativas artificiales superaron el 90 % entre el LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 y los resultados de la secuenciación 454.

### 11.1. Resumen de los datos

Las muestras artificiales de ITD de *FLT3* consistieron en una ITD positiva al 5 %, una ITD positiva al 50 % y una ITD negativa. Cada muestra artificial se analizó por triplicado utilizando dos lotes diferentes de mezclas maestras, dos operadores diferentes, durante el transcurso de 5 días no consecutivos, produciendo un total de 60 réplicas para cada muestra artificial. Se analizaron un total de 10 muestras clínicas, utilizando dos lotes de mezclas de reacción diferentes, con dos operadores diferentes a lo largo de 5 días no consecutivos, produciendo un total de 20 réplicas de cada muestra clínica. Por protocolo, las carreras con controles fallidos no se incluyeron en los análisis finales. Se logró una concordancia del 100 % y del 98 % para las muestras artificiales y clínicas, respectivamente (véase la Tabla 10: tamaño de la muestra de ITD y concordancia de las muestras). Los controles positivos y negativos no se incluyeron en los cálculos. La muestra clínica ITD-6 se clasificó de manera errónea en 4 de las 20 réplicas.

**Tabla 10.** Tamaño de la muestra de ITD y concordancia de las muestras con la secuenciación 454

| Muestra              | Resultado | N  | % de concordancia | Comentarios |
|----------------------|-----------|----|-------------------|-------------|
| <b>Control pos.</b>  | Positivo  | 17 | 100 %             | N/C         |
| <b>5 % positivo</b>  | Positivo  | 51 | 100 %             | N/C         |
| <b>50 % positivo</b> | Positivo  | 51 | 100 %             | N/C         |
| <b>ITD-1</b>         | Positivo  | 17 | 100 %             | N/C         |
| <b>ITD-3</b>         | Positivo  | 17 | 100 %             | N/C         |

**Tabla 10.** Tamaño de la muestra de ITD y concordancia de las muestras con la secuenciación 454

| Muestra             | Resultado | N  | % de concordancia | Comentarios                   |
|---------------------|-----------|----|-------------------|-------------------------------|
| <b>ITD-4</b>        | Positivo  | 17 | 100 %             | N/C                           |
| <b>ITD-5</b>        | Positivo  | 17 | 100 %             | N/C                           |
| <b>ITD-6</b>        | Negativo  | 4  | 20 %              | FAM (HEX picos 101 – 113 URF) |
|                     | Positivo  | 13 | 80 %              |                               |
| <b>ITD-7</b>        | Positivo  | 17 | 100 %             | N/C                           |
| <b>Control neg.</b> | Negativo  | 17 | 100 %             | N/C                           |
| <b>Negativo</b>     | Negativo  | 51 | 100 %             | N/C                           |
| <b>ITD-2</b>        | Negativo  | 17 | 100 %             | N/C                           |
| <b>ITD-8</b>        | Negativo  | 17 | 100 %             | N/C                           |
| <b>ITD-9</b>        | Negativo  | 17 | 100 %             | N/C                           |
| <b>ITD-10</b>       | Negativo  | 17 | 100 %             | N/C                           |

Las muestras artificiales de TKD de *FLT3* consistieron en una TKD positiva al 5 %, una TKD positiva al 50 % y una TKD negativa. Cada muestra artificial se analizó por triplicado utilizando dos lotes diferentes de mezclas de reacción, dos operadores diferentes, durante el transcurso de 5 días no consecutivos, produciendo un total de 60 réplicas para cada muestra artificial. Se analizaron un total de 10 muestras clínicas, utilizando dos lotes de mezclas de reacción diferentes, con dos operadores diferentes a lo largo de 5 días no consecutivos, produciendo un total de 20 réplicas de cada muestra clínica. Se logró una concordancia del 100 % para las muestras artificiales y clínicas (véase la Tabla 11: Tamaño de la muestra de TKD y concordancia de las muestras). Los controles positivos y negativos no se incluyeron en los cálculos. La muestra artificial negativa de TKD presentó tres de 60 réplicas que no se pudieron amplificar lo suficiente y, por tanto, se excluyeron del conjunto de análisis de NPA.

**Tabla 11.** Tamaño de la muestra de TKD y concordancia de las muestras con la secuenciación 454

| Muestra              | Resultado | N  | % de concordancia | Comentarios (discrepancias)           |
|----------------------|-----------|----|-------------------|---------------------------------------|
| <b>Control pos.</b>  | Positivo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>5 % positivo</b>  | Positivo  | 60 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>50 % positivo</b> | Positivo  | 60 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>TKD-2</b>         | Positivo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>TKD-3</b>         | Positivo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>TKD-4</b>         | Positivo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>TKD-6</b>         | Positivo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>TKD-7</b>         | Positivo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>TKD-10</b>        | Positivo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>Control neg.</b>  | Negativo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>Negativo</b>      | Negativo  | 57 | 100 %             | 3/60 (5 %) no amplificó lo suficiente |
| <b>TKD-1</b>         | Negativo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>TKD-5</b>         | Negativo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>TKD-8</b>         | Negativo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |
| <b>TKD-9</b>         | Negativo  | 20 | 100 %             | N/C                                   |

## 11.2. Análisis de los datos

Para las muestras negativas conocidas de ITD de *FLT3* se obtuvieron cero resultados discordantes (concordancia de 119/119), produciendo una NPA del 100 % (véase la Tabla 12: Concordancia porcentual de ITD con la secuenciación 454).

Para las muestras positivas conocidas de ITD de *FLT3* se obtuvieron 4 resultados discordantes (concordancia de 200/204), produciendo una PPA del 98,0 % (véase la Tabla 12: Concordancia porcentual de ITD con la secuenciación 454). La muestra clínica ITD-6 era una muestra positiva conocida para ITD de *FLT3* mediante secuenciación 454; sin embargo, cuatro de las 20 réplicas analizadas con el LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 dieron resultados negativos.

**Tabla 12.** Concordancia porcentual de ITD con la secuenciación 454

|            | Concordancia porcentual | N.º de discordancia | N.º de concordancia | *95 % LI |
|------------|-------------------------|---------------------|---------------------|----------|
| <b>NPA</b> | 100 %                   | 0                   | 119                 | 96,9 %   |
| <b>PPA</b> | 98,0 %                  | 4                   | 200                 | 95,1 %   |

\*Es de esperar que el 95 % de los resultados concuerden concordasen con la secuenciación a una tasa en un porcentaje mayor o igual que el límite inferior (LI).

Para las muestras negativas conocidas de TKD de *FLT3*, se obtuvieron cero resultados discordantes (137/137), produciendo una NPA del 100 % (véase la Tabla 13) entre los resultados de 454 y el LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0.

Para las muestras positivas conocidas de TKD de *FLT3*, se obtuvieron cero resultados discordantes (240/240), produciendo una PPA del 100 % (véase la Tabla 13:) entre los resultados de 454 y el LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0.

**Tabla 13.** Concordancia porcentual de TKD con la secuenciación 454.

|            | Concordancia porcentual | N.º de discordancia | N.º de concordancia | *95 % LI |
|------------|-------------------------|---------------------|---------------------|----------|
| <b>NPA</b> | 100 %                   | 0                   | 137                 | 96,9 %   |
| <b>PPA</b> | 100 %                   | 0                   | 240                 | 98,5 %   |

\*Es de esperar que el 95 % de los resultados concuerden con la secuenciación en un porcentaje mayor o igual que el límite inferior (LI).

El porcentaje general de aceptabilidad de las ejecuciones para ITD de *FLT3* y TKD de *FLT3* fue del 85 % y el 100 %, respectivamente. El porcentaje de validez de las muestras individuales para ITD y TKD fueron del 85 % y del 99,2 % respectivamente.

## 11.3. Conclusión

Esta validación proporciona evidencia documentada de que el LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 es capaz de detectar mutaciones ITD de *FLT3* y TKD de *FLT3* con una concordancia mínima del 90 % cuando se compara con la secuenciación 454.

## 12. Referencias

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. Servicio técnico y atención al cliente

### Datos de Contacto



Invivoscribe, Inc

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

Teléfono: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horario comercial: De 07:00 a 17:00 PST/PDT

Servicio técnico: [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com) | Atención al cliente: [sales@invivoscribe.com](mailto:sales@invivoscribe.com) | Sitio web: [www.invivoscribe.com](http://www.invivoscribe.com)

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

## 14. Símbolos

Los siguientes símbolos se usan en el etiquetado de los productos de diagnóstico de Invivoscribe.

|   |                                      |   |  |
|---|--------------------------------------|---|--|
|  | Número de Catálogo                   |  | Fecha de Caducidad                               |
|  | Volumen de Reactivo                  |  | Representante Autorizado en la Comunidad Europea |
|  | Número de Lote                       |  | Consulte las instrucciones de uso                |
|  | Condiciones de Conservación          |  | Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>             |
|  | Identificador Único de Dispositivo   |  | Fabricante                                       |
|  | Conformidad del Reino Unido Evaluada |  | Persona Responsable del Reino Unido              |
|  | Representante Autorizado en Suiza    |  | Conformidad Europea                              |

## 15. Aviso legal

Este producto es un producto de diagnóstico *in vitro*; no está disponible para la venta o el uso dentro de América del Norte.

### 15.1. Garantía y Responsabilidad

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) se compromete a proporcionar productos de la más alta calidad. Invivoscribe® garantiza que los productos cumplen o superan los estándares de rendimiento descritos en las Instrucciones de uso, en cuanto a los productos con dicho inserto. Si un producto está cubierto por las especificaciones del producto y no funciona según lo especificado, nuestra política es reemplazar el producto o acreditar el precio total de compra. Invivoscribe® no proporciona ninguna otra garantía de ningún tipo, expresa o implícita. La responsabilidad de Invivoscribe® no excederá el precio de compra del producto. Invivoscribe no será responsable de los daños directos, indirectos, consecuentes o incidentales que surjan del uso, los resultados del uso o la incapacidad de usar sus productos; la eficacia del producto bajo condiciones controladas por el comprador en el laboratorio del comprador debe establecerse y monitorearse continuamente a través de procesos definidos y controlados por el comprador que incluyen, entre otros, pruebas de controles positivos, negativos y en blanco validados internamente cada vez que se analiza una muestra. El pedido, la aceptación y el uso del producto constituyen la aceptación del comprador de la responsabilidad exclusiva de garantizar la eficacia del producto y el acuerdo del comprador con la limitación de responsabilidad establecida en este párrafo.

### 15.2. Patentes y Marcas

Muchos de estos productos requieren métodos de amplificación de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ninguna licencia bajo estas patentes para usar procesos de amplificación o enzimas se otorga expresa o implícitamente al comprador por la compra de este producto.

©2023 Invivoscribe, Inc. Todos los derechos reservados. Las marcas registradas mencionadas aquí son propiedad de Invivoscribe, Inc. y/o sus afiliados, o (en cuanto a las marcas registradas de otros utilizadas aquí) sus respectivos dueños.