

Istruzioni per l'uso



## LeukoStrat<sup>®</sup> *FLT3* Mutation Assay 2.0

Per l'identificazione di mutazioni per duplicazione tandem interna (ITD) e mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD) nel gene che codifica per la tirosina chinasi 3 fms-simile (*FLT3*).

**IVD** Per uso diagnostico *in vitro*.



 Condizioni  
di conservazione: da **-85 °C a -65 °C**  
(I controlli di DNA possono essere separati dai kit del saggio e conservati  
a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C)

**N. di catalogo**

**REF** 94120091

**Prodotti**

LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection

**Quantità**

33 reazioni

# Indice

<b>1.</b>	<b>USO PREVISTO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST .....</b>	<b>3</b>
2.1.	Sfondo .....	3
2.2.	Sommario .....	3
<b>3.</b>	<b>PRINCIPI DELLA PROCEDURA.....</b>	<b>3</b>
3.1.	Mutazioni per duplicazione tandem interna (ITD) di <i>FLT3</i> .....	3
3.2.	Mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD) di <i>FLT3</i> .....	3
3.3.	Rilevamento differenziale in fluorescenza.....	4
<b>4.</b>	<b>REAGENTI .....</b>	<b>5</b>
4.1.	Componenti dei reagenti.....	5
4.2.	Avvertenze e precauzioni .....	6
4.3.	Conservazione e manipolazione.....	6
<b>5.</b>	<b>STRUMENTI .....</b>	<b>7</b>
5.1.	Termociclatore .....	7
5.2.	ABI 3130/3130xl o 3500/3500xL .....	7
<b>6.</b>	<b>RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI .....</b>	<b>8</b>
6.1.	Precauzioni.....	8
6.2.	Sostanze interferenti .....	8
6.3.	Requisiti e manipolazione dei campioni .....	8
6.4.	Preparazione del campione.....	8
6.5.	Conservazione dei campioni.....	8
<b>7.</b>	<b>PROCEDURA DEL SAGGIO .....</b>	<b>9</b>
7.1.	Materiali forniti .....	9
7.2.	Materiali necessari, ma non forniti.....	9
7.3.	Preparazione dei reagenti .....	10
7.4.	Amplificazione .....	11
7.5.	Digestione di restrizione solo per la <i>FLT3</i> D835 Master Mix.....	11
7.6.	Rilevamento della fluorescenza ABI.....	12
7.7.	Controllo di qualità.....	12
<b>8.</b>	<b>INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI .....</b>	<b>13</b>
8.1.	Analisi.....	13
8.2.	Interpretazione del campione.....	14
<b>9.</b>	<b>LIMITI DELLA PROCEDURA.....</b>	<b>14</b>
<b>10.</b>	<b>DIMENSIONI ATTESE DEI PRODOTTI AMPLIFICATI .....</b>	<b>14</b>
10.1.	Dimensioni attese dei prodotti amplificati .....	14
10.2.	Dati del campione.....	15
<b>11.</b>	<b>CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI .....</b>	<b>16</b>
11.1.	Riepilogo dei dati.....	16
11.2.	Analisi dei dati .....	17
11.3.	Conclusione .....	18
<b>12.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>18</b>
<b>13.</b>	<b>ASSISTENZA TECNICA E ASSISTENZA CLIENTI .....</b>	<b>18</b>
<b>14.</b>	<b>SIMBOLI .....</b>	<b>19</b>
<b>15.</b>	<b>AVVISO LEGALE .....</b>	<b>19</b>
15.1.	Garanzia e Responsabilità .....	19
15.2.	Brevetti e marchi .....	19

## 1. Uso previsto

Il LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 è un prodotto per diagnostica *in vitro* destinato al rilevamento basato su PCR di mutazioni attivanti *FLT3* in pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (LMA).

In particolare, l'*FLT3* Mutation Assay 2.0 può essere utilizzato per:

- Identificare duplicazioni tandem interne (ITD) nel gene *FLT3*.
- Identificare mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD) nel gene *FLT3*.

## 2. Sommario e spiegazione del test

### 2.1. Sfondo

La leucemia mieloide acuta (LMA) solitamente ha una prognosi sfavorevole. La valutazione dello stato mutazionale del gene che codifica per il recettore tirosina chinasi 3 fms-simile (*FLT3*) nella LMA con cariotipo normale è l'indicatore prognostico più importante dell'esito della malattia, ed è spesso fondamentale, dal momento che numerosi studi sulla LMA hanno mostrato che la presenza di mutazioni in grado di attivare *FLT3* è predittiva di una prognosi sfavorevole<sup>1,2</sup>. Pertanto, è necessario analizzare le mutazioni che attivano *FLT3* per stratificare la malattia e stabilire le opzioni terapeutiche appropriate. Questo saggio di PCR LeukoStrat ha come bersaglio regioni del gene *FLT3* al fine di permettere l'identificazione di mutazioni per duplicazione tandem interna (ITD) e mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD), quali D835 e I836.

### 2.2. Sommario

Il presente saggio non consente di rilevare in modo affidabile mutazioni di *FLT3* a carico di meno del 5% della popolazione cellulare totale. Va sottolineato che i risultati dei test molecolari per l'analisi mutazionale devono sempre essere interpretati nel contesto dei dati clinici, istologici e immunofenotipici.

Nel kit del test sono incluse 2 master mix principali: la *FLT3* ITD Master Mix per il rilevamento di mutazioni per duplicazione tandem interna e la *FLT3* D835 Master Mix per il rilevamento di mutazioni nella regione TKD (quali le mutazioni D835 e I836).

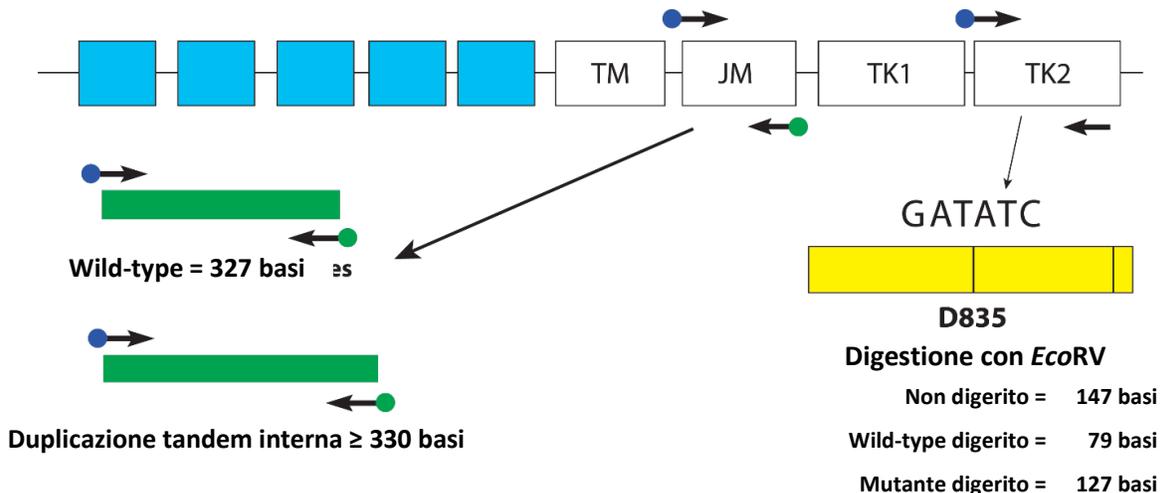
## 3. Principi della procedura

### 3.1. Mutazioni per duplicazione tandem interna (ITD) di *FLT3*

Le mutazioni per duplicazione tandem interna o mutazioni di lunghezza di *FLT3* sono dovute alla duplicazione e inserzione di una porzione del gene *FLT3* che comprende la regione situata all'interno e intorno alla regione juxtamembrana (JM) del gene *FLT3* stesso. Tali mutazioni variano in relazione sia alla posizione sia alla lunghezza della sequenza di DNA duplicato inserita. Le mutazioni ITD determinano l'autofosforilazione e attivazione costitutiva di *FLT3*<sup>1</sup>. Con questo saggio, gli alleli *FLT3* wild-type si amplificano e danno origine a un prodotto di 327 coppie di basi (bp), mentre gli alleli contenenti mutazioni ITD generano un prodotto  $\geq 330$  bp.

### 3.2. Mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD) di *FLT3*

Le mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD) di *FLT3* sono causate da sostituzioni di acidi nucleici che producono una modifica della sequenza amminoacidica in questo centro catalitico altamente conservato. Le mutazioni TKD, come D835 e I836, determinano l'autofosforilazione e attivazione costitutiva di *FLT3*<sup>2</sup>. Gli alleli wild-type del gene *FLT3* comprendono un sito di digestione di restrizione EcoRV. Quando si verifica la sostituzione di un acido nucleico, il sito di riconoscimento della digestione di restrizione scompare e l'endonucleasi EcoRV non è in grado di identificare e digerire il DNA in corrispondenza di questo sito. I nostri test impiegano primer situati su entrambi i lati della regione TKD. La regione bersaglio di *FLT3* viene amplificata mediante PCR, dopodiché viene effettuata una digestione di restrizione con EcoRV. Uno dei primer di PCR contiene un sito di restrizione EcoRV, per cui vengono digeriti sia gli alleli wild-type sia quelli mutanti. Lo schema di digestione permette di identificare la perdita della sequenza genica normale e garantisce l'avvenuta digestione. Gli alleli wild-type del gene *FLT3* danno origine a prodotti di 79 bp, mentre gli alleli mutanti generano prodotti di 124 bp o 127 bp. Gli ampliconi non digeriti sono lunghi 147 bp (la lunghezza dei prodotti corrisponde ai risultati ottenuti mediante l'uso del GeneScan™ - 600™ LIZ Size Standard v2.0 e dello strumento ABI3500xL. L'impiego di standard di riferimento e strumenti diversi può dar luogo a prodotti aventi dimensioni diverse).



**Figura 1.** Rappresentazione della regione JM di *FLT3* e del loop di attivazione del dominio chinasi. I puntini verdi e blu con le frecce nere rappresentano le posizioni relative dei primer che hanno come bersaglio la regione JM per le ITD, mentre il puntino blu rimanente e le altre frecce nere rappresentano le posizioni relative dei primer che hanno come bersaglio le mutazioni TKD nel loop di attivazione del dominio chinasi. Il rettangolo giallo presenta linee nere verticali che rappresentano la posizione dei siti di digestione di restrizione *EcoRV* nell'allele wild-type.

### 3.3. Rilevamento differenziale in fluorescenza

Il rilevamento differenziale in fluorescenza viene comunemente adoperato per risolvere ampliconi di dimensioni diverse utilizzando uno strumento per elettroforesi capillare. I primer possono essere coniugati con svariati coloranti fluorescenti (fluorofori) in modo da produrre spettri di emissione diversi dopo eccitazione da parte di un laser nello strumento per elettroforesi capillare. In tal modo, i diversi coloranti fluorescenti potranno corrispondere a regioni bersaglio diverse. Questo sistema di rilevamento offre elevata sensibilità, risoluzione fino al singolo nucleotide, rilevamento differenziale dei prodotti e quantificazione relativa. Inoltre, permette di eliminare quasi totalmente l'impiego di gel di agarosio e poliacrilammide, così come l'uso di agenti cancerogeni quali il bromuro di etidio. Il rilevamento differenziale consente anche un'interpretazione accurata, riproducibile e obiettiva dei prodotti primer-specifici e l'archiviazione automatica dei dati. La riproducibilità inter- e intra-saggio della determinazione delle dimensioni mediante elettroforesi capillare è di circa 1-2 nucleotidi. Tale riproducibilità e sensibilità, combinate con l'archiviazione automatica dei dati dei campioni, permettono il monitoraggio, la tracciatura e il confronto dei dati dei singoli pazienti nel tempo.

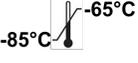
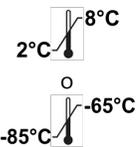
## 4. Reagenti

### 4.1. Componenti dei reagenti

**Tabella 1.** Kit disponibili

N. di catalogo	Descrizione	Reazioni totali
 94120091	LeukoStrat <i>FLT3</i> Mutation Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection	33

**Tabella 2.** Componenti del kit del LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0

Reagente	N. di catalogo	Componenti del reagente (ingredienti attivi)	Quantità unitaria	N. di unità	Temp. di conservazione
<b>Master mix</b>	24120011CE	<b><i>FLT3</i> ITD Master Mix – 6FAM &amp; HEX</b> Oligonucleotidi multipli per il gene <i>FLT3</i> in tampone salino.	1500 µl	1	
	24120031CE	<b><i>FLT3</i> D835 Master Mix – 6FAM</b> Oligonucleotidi multipli per la regione TKD di <i>FLT3</i> in tampone salino.	1500 µl	1	
<b>DNA di controllo positivo</b>	40883390	<b><i>FLT3</i> ITD Positive Control</b> 50 µg/ml di DNA in soluzione TE 1/10	100 µl	1	
	40883400	<b><i>FLT3</i> D835 Positive Control</b> 50 µg/ml di DNA plasmidico in soluzione TE 1/10	100 µl	1	
<b>DNA di controllo negativo (normale)</b>	40920030	<b><i>FLT3</i> Negative Control</b> 50 µg/mL di DNA in soluzione TE 1/10	100 µl	1	

## 4.2. Avvertenze e precauzioni

### IMPORTANTE!

Leggere attentamente le Istruzioni per l'uso prima di iniziare la procedura di analisi e seguire attentamente ogni passaggio.

- **IVD** Questo prodotto è per uso diagnostico *in vitro*.
- Il kit del saggio deve essere utilizzato come un sistema. Non utilizzare reagenti di altri produttori. La diluizione, la riduzione dei volumi delle reazioni di amplificazione o altre deviazioni da questo protocollo possono influire sulle prestazioni di questo test e/o invalidare eventuali sublicenze limitate concesse con l'acquisto di questo kit di analisi.
- I materiali sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando conservati e maneggiati come indicato. Non utilizzare i kit oltre la data di scadenza.
- Il rigoroso rispetto del protocollo garantisce prestazioni e riproducibilità ottimali. Occorre prestare attenzione per garantire l'uso dei programmi del termociclatore corretti, poiché altri programmi potrebbero fornire dati imprecisi/errati, come risultati falsi positivi e falsi negativi.
- Utilizzare unicamente EcoRV come enzima di restrizione per la digestione, poiché l'impiego di un enzima di restrizione errato può produrre risultati falsi positivi o negativi.
- Non miscelare o combinare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi.
- Tutte le procedure di laboratorio devono essere eseguite con dispositivi di protezione individuale standard (guanti, camici da laboratorio e occhiali protettivi). Il personale di laboratorio deve seguire le buone pratiche di laboratorio e le precauzioni universali quando lavora con i campioni. I campioni devono essere maneggiati in strutture di contenimento di biosicurezza approvate e aperti solo in cappe di biosicurezza certificate.
- Per la preparazione del DNA del campione si raccomanda di utilizzare acqua per biologia molecolare.
- A causa della sensibilità analitica di questo test, è necessario prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti o delle miscele di amplificazione con campioni, controlli o materiali amplificati. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per la presenza di segni di contaminazione (ad es. controlli negativi che danno segnali positivi). Smaltire i reagenti di cui si sospetta la contaminazione.
- Per ridurre al minimo la contaminazione, indossare guanti puliti quando si maneggiano campioni e reagenti e pulire regolarmente le aree di lavoro e le pipette prima di eseguire la PCR.
- Il flusso di lavoro nel laboratorio di PCR deve essere unidirezionale tra le distinte aree di lavoro: iniziare con la preparazione della master mix, passare alla preparazione del campione, quindi all'amplificazione e infine al rilevamento. La sterilizzazione in autoclave non elimina la contaminazione del DNA. Non portare il DNA amplificato nelle aree destinate alla preparazione delle master mix o dei campioni. Tutte le pipette, i puntali delle pipette e qualsiasi apparecchiatura utilizzata in una determinata area devono essere dedicati a quella zona del laboratorio e non vanno spostati.
- Gli articoli che non sono monouso devono essere decontaminati in candeggina al 10% e risciacquati con acqua distillata due volte in due momenti diversi prima di essere riportati nelle aree di partenza. Quando possibile, utilizzare materiale da laboratorio in plastica sterile usa e getta per evitare la contaminazione.

## 4.3. Conservazione e manipolazione

- Se non utilizzati immediatamente, i kit del saggio devono essere conservati a una temperatura compresa tra **-85 °C e -65 °C**.
- La temperatura di conservazione ottimale per i controlli di DNA è di 2 °C - 8 °C, ma possono anche essere conservati da -85 °C a -65 °C.
- Tutti i reagenti e i controlli devono essere scongelati e passati al vortex o mescolati accuratamente prima dell'uso per garantire che siano completamente risospesi. L'agitazione eccessiva al vortex può danneggiare il DNA e causare il distacco dei fluorofori dai primer marcati.
- I materiali sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando conservati e maneggiati come indicato. Non utilizzare i kit oltre la data di scadenza.
- A causa delle elevate concentrazioni di sali, le master mix per PCR sono sensibili ai cicli di congelamento/scongelo. Aliquotare le master mix in provette sterili provviste di tappo a vite e o-ring, se necessario.

## 5. Strumenti

### 5.1. Termociclatore

- Uso o funzione: amplificazione dei campioni di DNA
- Strumento consigliato: termociclatore Veriti™ Dx o equivalente
- Caratteristiche prestazionali e specifiche:
  - Intervallo termico minimo: da 15 °C a 96 °C
  - Velocità di rampa minima: 0,8 °C/s
- Seguire le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione e manutenzione del produttore.
- Consultare la sezione 7.4 *Amplificazione* per il programma del termociclatore.

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

- Uso o funzione: rilevamento e analisi dei frammenti
- Caratteristiche prestazionali e specifiche:
- Gli strumenti per elettroforesi capillare indicati di seguito soddisfano le esigenze prestazionali di questo saggio:
  - Analizzatore genetico\* ABI 3130 (4-capillari)
  - Analizzatore genetico\* ABI 3130xl (16-capillari)
  - Analizzatore genetico\* ABI 3500 (8-capillari)
  - Analizzatore genetico\* ABI 3500xL (24-capillari)
- Seguire le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione e manutenzione del produttore.
- Gli analizzatori genetici devono essere calibrati con il DS-33 Matrix Standard per Dye Set G5 (raccomandato). Con la serie 3130 può essere utilizzato il DS-30 Matrix Standard per Dye Set D (opzione alternativa).
- Utilizzare le impostazioni predefinite per il proprio polimero e tipo di capillare.
- Consultare la sezione 7.6 *Rilevamento della fluorescenza ABI* per la preparazione del campione.

**\*Avvertenza:** questi prodotti non sono provvisti di marchio CE.

## 6. Raccolta e preparazione dei campioni

### 6.1. Precauzioni

I campioni biologici umani possono contenere materiali potenzialmente infettivi. Tutti i campioni devono essere maneggiati conformemente agli standard riferibili ai patogeni a trasmissione ematica e/o al livello di biosicurezza 2 del proprio istituto.

### 6.2. Sostanze interferenti

È noto che le seguenti sostanze interferiscono con la PCR:

- Chelanti cationici divalenti
- Puntali per pipetta a bassa ritenzione
- EDTA (non significativo a basse concentrazioni)
- Eparina
- Cellule sospese in un fissativo, quale acido acetico, B5, ecc.

### 6.3. Requisiti e manipolazione dei campioni

Questo saggio permette di analizzare il DNA genomico proveniente da diverse fonti:

- Sangue periferico o aspirato midollare anticoagulato con eparina, EDTA, ACD o cellule mononucleate isolate in precedenza, siano esse fresche in un terreno appropriato (RPMI o simile) o congelate in un terreno di criopreservazione appropriato.
- Il sangue periferico e l'aspirato midollare possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per 7 giorni e continuare a fornire risultati validi. Le cellule mononucleate isolate possono essere conservate fresche fino a un massimo di 7 giorni o indefinitamente se correttamente criopreservate.
- 500 ng di DNA genomico (conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C o inferiore a -15 °C e spedito a temperatura ambiente, in condizioni di freddo o su ghiaccio secco).

### 6.4. Preparazione del campione

Estrarre il DNA genomico dai campioni del paziente il più presto possibile. I campioni di DNA vanno standardizzati alla concentrazione finale di 50 µg/ml.

### 6.5. Conservazione dei campioni

Il DNA genomico deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C o inferiore a -15 °C.

## 7. Procedura del saggio

### 7.1. Materiali forniti

Consultare la Tabella 2 per l'elenco dei materiali forniti con ogni kit.

### 7.2. Materiali necessari, ma non forniti

**Tabella 3.** Materiali necessari, ma non forniti

Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali consigliati e produttori	N. di catalogo	Note
<b>DNA polimerasi</b>	Roche®: <ul style="list-style-type: none"> <li>DNA polimerasi EagleTaq™</li> </ul> Invivoscribe, Inc. <ul style="list-style-type: none"> <li>DNA polimerasi FalconTaq o equivalente</li> </ul>	05206944190  60970130	N/A
<b>Acqua distillata in vetro, deionizzata per biologia molecolare o acqua purificata per uso farmaceutico</b>	N/A	N/A	L'acqua deve essere sterile e priva di DNasi e RNasi.
<b>Pipette calibrate</b>	BIOHIT: <ul style="list-style-type: none"> <li>Proline®</li> <li>eLine®</li> </ul> Rainin: <ul style="list-style-type: none"> <li>Pipette P-2, P-20, P-200 e P-1000 o</li> <li>pipette SL-2, SL-20, SL-200 e SL-1000</li> </ul>	N/A	Devono essere in grado di misurare con precisione volumi compresi tra 1 µl e 1000 µl.
<b>Termociclatore</b>	Life Technologies: <ul style="list-style-type: none"> <li>Termociclatore Veriti™ Dx</li> </ul>	4452300	N/A
<b>Endonucleasi EcoRV</b>	New England Biolabs <ul style="list-style-type: none"> <li>EcoRV 20.000 unit à/ml</li> </ul>	R0195S o R0195L	N/A
<b>NEBuffer 3.1</b>	New England Biolabs <ul style="list-style-type: none"> <li>NEBuffer 3.1</li> </ul>	B7203S	Incluso con l'enzima di restrizione EcoRV
<b>Agitatore vortex</b>	N/A	N/A	N/A
<b>Piastre o provette per PCR</b>	N/A	N/A	Sterili
<b>Puntali per pipette con filtro</b>	N/A	N/A	Privi di RNasi, DNasi, apirogeni, sterili
<b>Provette per microcentrifuga</b>	N/A	N/A	Sterili
<b>Strumento per elettroforesi capillare ABI</b>	Applied Biosystems®: <ul style="list-style-type: none"> <li>Analizzatore genetico serie ABI 3130</li> <li>Analizzatore genetico serie ABI 3500</li> </ul>	313001R o 3130XLR 4406017 o 4406016	N/A
<b>Formammide Hi-Di</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Formammide Hi-Di™</li> </ul>	4440753	N/A
<b>Standard di riferimento</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Raccomandato per le serie ABI 3130 e ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan™ 600™ LIZ® dye Size Standard v2.0</li> </ul> </li> <li>Alternativa per la serie ABI 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan™ - 400HD ROX™ dye Size Standard</li> </ul> </li> </ul>	4408399  402985 o 4310366	N/A

Tabella 3. Materiali necessari, ma non forniti

Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali consigliati e produttori	N. di catalogo	Note
<b>Set di coloranti D o G5 per calibrazione spettrale</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Raccomandato per le serie ABI 3130 e ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)</li> </ul> </li> <li>Opzione alternativa per la serie ABI 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D)</li> </ul> </li> </ul>	4345833 4345827	N/A
<b>Polimero</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Polimero POP-7: <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7™ per la serie 3130</li> <li>POP-7™ per la serie 3500</li> </ul> </li> </ul>	4352759 o 4363785 4393708 o 4393714 o A26073	N/A
<b>Tampone</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Per la serie ABI 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>Tampone di corsa 310 e 31xx, 10x</li> </ul> </li> <li>Per 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 4393927 4408256	N/A
<b>Foglio di alluminio per piastre a 96 pozzetti</b>	N/A	N/A	N/A
<b>Strip di 8 tappi per piastre a 96 pozzetti</b>	N/A	N/A	N/A

### 7.3. Preparazione dei reagenti

Per ciascuna master mix devono essere analizzati i controlli **positivo, negativo e senza template**.

**Opzionale:** tutti i campioni non noti possono essere analizzati con la Specimen Control Size Ladder Master Mix. Ciò ha lo scopo di accertare che non sia presente alcun inibitore dell'amplificazione e che il DNA sia di qualità e quantità sufficienti per produrre un risultato valido. La Specimen Control Size Ladder Master Mix può essere acquistata separatamente presso Invivoscribe ([REF](#) 20960021 per il rilevamento ABI).

### Mix di amplificazione

- 7.3.1. Pulire la cappa per PCR con candeggina al 10%, poi con acqua e infine con etanolo al 70%.
- 7.3.2. Indossando guanti, prelevare le master mix dal freezer. Lasciare che le provette si scongelino completamente (evitare l'esposizione diretta alla luce), quindi passarle delicatamente al vortex o capovolgerle 5-10 volte per mescolarle adeguatamente.
- 7.3.3. In una cappa di contenimento o in una cappa per PCR, rimuovere un'aliquota appropriata da ciascuna master mix e trasferirla in singole provette per microcentrifuga pulite e sterili.
- I volumi delle aliquote devono essere pari a **45 µl per ciascuna reazione**.
  - È consigliabile aggiungere un'ulteriore reazione ogni 15 reazioni per compensare errori di pipettamento.
  - Pertanto, per ogni master mix, il numero di reazioni (**n**) deve essere:

<b>n =</b>	<b>1 × N. di campioni</b>	
	<b>+ 1</b>	DNA di controllo positivo ( <b>FLT3 Positive Control</b> )
	<b>+ 1</b>	DNA di controllo negativo ( <b>FLT3 Negative Control</b> )
	<b>+ 1</b>	controllo senza template (acqua)
	<b>+ 1</b>	per compensare errori di pipettamento
<b>n = N. di campioni + 4 Totale</b>		
  - Pertanto, il volume totale delle aliquote per ogni master mix deve essere **n × 45 µl**.
- 7.3.4. Aggiungere 1,25 unità (o 0,25 µl a 5 unità/µl) di DNA polimerasi Taq per reazione a ogni master mix.
- La DNA polimerasi totale aggiunta a ogni master mix deve essere **n × 0,25 µl**.
  - Capovolgere le provette diverse volte per mescolarne adeguatamente il contenuto.

- 7.3.5. Per ogni reazione, aliquotare 45 µl della master mix appropriata + soluzione di DNA polimerasi in singoli pozzetti su una piastra per PCR o in una provetta.
- 7.3.6. Aggiungere 5 µl di templat appropriato (DNA del campione alla concentrazione di 50 µg/ml, DNA di controllo positivo, DNA di controllo negativo o acqua) nei singoli pozzetti contenenti le rispettive soluzioni master mix.
- Pipettare 5-10 volte su e giù per mescolare.
- 7.3.7. Tappare o coprire la piastra per PCR.
- A questo punto, i campioni sono pronti per essere amplificati su un termociclatore.

**Tabella 4.** Preparazione della reazione

Reagente	Volume
Master mix	45 µl
DNA polimerasi Taq	0,25 µl
DNA del campione o di controllo	5 µl
Volume totale	50,25 µl

## 7.4. Amplificazione

- 7.4.1. Amplificare i campioni con il seguente programma di PCR:

**Tabella 5.** Programma della PCR

Fase	Temperatura	Durata	Ciclo
1	95 °C	5 minuti	1
2	94 °C	30 secondi	35x
3	55 °C	30 secondi	
4	72 °C	60 secondi	
5	72 °C	60 minuti	1
6	4 °C	∞ (illimitata)	1

- 7.4.2. Rimuovere la piastra di amplificazione o le provette dal termociclatore.
- Conservare gli ampliconi a una temperatura compresa tra 2 ° C e 8 ° C fino al momento dell'analisi sullo strumento ABI 3130/3130xL o ABI 3500/3500xL.

## 7.5. Digestione di restrizione solo per la *FLT3* D835 Master Mix

- 7.5.1. Indossando guanti, prelevare il NEBuffer 3.1 dal freezer. Lasciarlo scongelare completamente, quindi passarlo delicatamente al vortex per mescolarlo.
- 7.5.2. In una cappa di contenimento o in una cappa per PCR, aggiungere quanto segue in una singola provetta per microcentrifuga pulite e sterile.
- È consigliabile aggiungere un'ulteriore reazione ogni 15 reazioni per compensare errori di pipettamento.
  - Pertanto, il numero di reazioni (**n**) deve essere:

$$n = \frac{\text{N. di campioni} + 1}{\text{per per compensare errori di pipettamento}}$$

$$n = \text{N. di campioni} + 1 \quad \text{Totale}$$

- 7.5.3. Per ogni reazione, aggiungere 15,7 µl di acqua per biologia molecolare nella provetta.
- Il volume totale di acqua aggiunta deve essere pari a **n × 15,7 µl**.
- 7.5.4. Per ogni reazione, aggiungere 2,3 µl di NEBuffer 3.1 nella provetta.
- Il volume totale di NEBuffer 3.1 aggiunto deve essere pari a **n × 2,3 µl**.
- 7.5.5. Per ogni reazione, aggiungere 2 µl di endonucleasi EcoRV (20.000 unità/ml) nella provetta.
- Il volume totale di endonucleasi EcoRV aggiunta deve essere pari a **n × 2 µl**.
  - Passare delicatamente al vortex per mescolare.

- 7.5.6. Per ogni reazione, aliquotare 20 µl di questa miscela in singoli pozzetti su una piastra per PCR o in una provetta.
- 7.5.7. Aggiungere 10 µl di ciascun amplicone *FLT3* D835 nei pozzetti corrispondenti contenenti la miscela per la digestione di restrizione.
  - Pipettare su e giù diverse volte per mescolare.
- 7.5.8. Tappare o coprire la piastra per PCR.
- 7.5.9. Incubare a 37 °C per almeno 60 minuti e per un massimo di 24 ore.
  - Sebbene il DNA amplificato sia stabile a temperatura ambiente per lunghi periodi di tempo, i prodotti di PCR devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino al momento del rilevamento.
  - Il rilevamento va effettuato entro 30 giorni dall'amplificazione.

## 7.6. Rilevamento della fluorescenza ABI

Si tenga presente che per il rilevamento della fluorescenza ABI è spesso visibile un picco precedente, ma si tratta di un artefatto dovuto al metodo di rilevamento utilizzato dalle piattaforme ABI. I picchi precedenti sono talvolta distorti e presentano basi in pendenza sul lato destro verso il picco vero e proprio.

**Avvertenza:** non è consigliabile il multiplexing di prodotti di PCR provenienti da master mix diverse, in quanto ciò riduce la sensibilità complessiva del saggio.

- 7.6.1. In una nuova provetta per microcentrifuga, miscelare una quantità adeguata (per un totale di 10 µl per ogni reazione di PCR) di formammide Hi-Di e 600 LIZ™ Size Standards v2.0. Mescolare bene al vortex.
- 7.6.2. In una nuova piastra per PCR da 96 pozzetti, aggiungere 10 µl di formammide Hi-Di con 600 LIZ™ Size Standard v2.0 in singoli pozzetti per ciascuna reazione di PCR.
- 7.6.3. Trasferire 0,5 µl di ciascun amplicone nei pozzetti contenenti formammide Hi-Di con 600 LIZ™ Size Standard v2.0. Aggiungere un solo campione per pozzetto. Pipettare su e giù per mescolare.
- 7.6.4. Sigillare la piastra per PCR con un foglio di alluminio o con strip di 8 tappi per PCR.
- 7.6.5. Denaturare termicamente i campioni a 95 °C per 3 minuti, quindi abbassare rapidamente la temperatura trasferendoli direttamente su ghiaccio o a 4 °C per 5 minuti.
- 7.6.6. Preparare un foglio campioni e un elenco delle iniezioni per i campioni.
- 7.6.7. Analizzare i campioni con uno strumento per elettroforesi capillare ABI secondo le istruzioni del relativo manuale.
- 7.6.8. I dati vengono visualizzati automaticamente come picchi di dimensione e colore specifici. Esaminare il profilo e i controlli, elaborare un report dei risultati. (Consultare le sezioni 8: *Interpretazione dei risultati* e 10: *Dimensioni attese dei prodotti amplificati* di seguito.)

## 7.7. Controllo di qualità

Con il kit sono forniti controlli positivi e negativi (o normali), che devono essere analizzati in singolo ogni volta che si effettua il saggio per garantire che sia stato eseguito correttamente. Inoltre, occorre anche includere un controllo senza template (ad es. acqua) per verificare l'eventuale contaminazione della master mix o contaminazione crociata delle reazioni di PCR dovute all'impiego di una tecnica inadeguata. È possibile anche aggiungere un controllo costituito da tampone per assicurarsi che non si sia verificata alcuna contaminazione del tampone utilizzato per risospendere i campioni. I valori dei controlli positivi sono riportati nella sezione 10: *Dimensioni attese dei prodotti amplificati*.

## 8. Interpretazione dei risultati

Sia i risultati positivi che quelli negativi devono essere interpretati nel contesto di tutte le informazioni cliniche e dei risultati di tutte le analisi di laboratorio. Il range di dimensioni per ogni master mix è stato determinato analizzando campioni di controllo positivi e negativi. Per un'interpretazione accurata e significativa è importante ignorare i picchi che si verificano al di fuori del range di dimensioni valide per ciascuna master mix.

- Tenere presente che potrebbe esservi una variabilità di +/-1 bp nelle dimensioni dei frammenti inerente allo strumento ABI.

### 8.1. Analisi

- 8.1.1. I campioni per i quali non si riesce a ottenere un'amplificazione a seguito di ripetute prove devono essere refertati come "Non è possibile riportare un risultato per questo campione in quanto il DNA era di qualità o quantità insufficienti per l'analisi".
- 8.1.2. I primer diretti e inversi della *FLT3* ITD Master Mix sono marcati, rispettivamente, con FAM (blu) e HEX (verde). I picchi wild-type (327 bp) e mutante (qualsiasi picco  $\geq$  330 bp) devono contenere sia un picco blu sia un corrispondente picco verde per essere considerati picchi veri e propri.
- 8.1.3. I primer della *FLT3* TKD Master Mix sono marcati solo con FAM. Un risultato *FLT3* TKD positivo consiste in un picco mutante che è  $\geq$  1% del picco WT. Per calcolare questo valore, dividere l'altezza del picco mutante (124 bp o 127 bp per i campioni dei pazienti e 124 bp per il controllo positivo) per l'altezza del picco WT (79 bp). Un risultato negativo consiste in un picco mutante che è  $<$  1,0% del picco WT.
- 8.1.4. Occorre esaminare tutti i controlli del saggio prima di procedere all'interpretazione dei risultati dei campioni. Se i controlli non producono i risultati corretti, il saggio non è valido e i campioni non devono essere interpretati.

**Di seguito sono descritte l'analisi di ciascun controllo e le decisioni da prendere sulla base dei risultati ottenuti.**

**Tabella 6.** Analisi dei controlli

Tipo di controllo	Risultato atteso	Risultato aberrante
<b>Controllo senza template <i>FLT3</i> ITD</b>	Nessun picco $\geq$ 100 RFU e maggiore di 50 bp.	Amplificazione presente, ripetere il saggio.
<b>Controllo negativo <i>FLT3</i> ITD</b>	Picco blu e verde a 327 bp $\geq$ 4.500 RFU	Amplificazione insufficiente, rilevato/i picco/picchi positivo/i; ripetere il saggio.
<b>Controllo positivo <i>FLT3</i> ITD</b>	Picco blu e verde a 327 bp $\geq$ 4.500 RFU e un picco blu e verde a 357 bp $\geq$ 100 RFU	Amplificazione insufficiente, picco mutante assente; ripetere il saggio.
<b>Controllo senza template <i>FLT3</i> TKD</b>	Nessun picco $\geq$ 100 RFU e maggiore di 50 bp.	Amplificazione presente, ripetere il saggio.
<b>Controllo negativo <i>FLT3</i> TKD</b>	Picco blu a 79 bp $\geq$ 4.500 RFU.	Amplificazione insufficiente, rilevato/i picco/picchi positivo/i; ripetere il saggio.
<b>Controllo positivo <i>FLT3</i> D835</b>	Picco blu a 79 bp $\geq$ 4.500 RFU e un picco blu a 124 bp $\geq$ 1% del picco WT.	Amplificazione insufficiente, picco mutante $<$ 1,0%; ripetere il saggio.
<b>Specimen Control Size Ladder</b> (opzionale)	Tutti i picchi di 96, 197, 297, 397 e 602 bp sono presenti.  Dal momento che vengono preferenzialmente amplificati frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è inconsueto che il frammento di 600 bp presenti un segnale ridotto o che sia del tutto assente. Continuare con l'analisi.	Se non è visibile alcun picco, ripetere il saggio, <u>a meno che il campione non risulti positivo.</u>  Se sono visibili solo 1, 2 o 3 picchi, rivalutare il campione per verificare l'eventuale degradazione del DNA, <u>a meno che il campione non risulti positivo.</u>

## 8.2. Interpretazione del campione

Presupponendo che i controlli producano i risultati attesi, i campioni clinici devono essere interpretati come segue:

**Tabella 7.** Interpretazione del campione

<b>FLT3 ITD Master Mix:</b>	
<b>Positivo:</b>	La presenza di picchi mutanti (sia FAM che HEX) $\geq 330$ bp e $\geq 100$ RFU viene refertata come: <b>"Rilevamento di una mutazione ITD del gene FLT3"</b> .
<b>Negativo:</b>	La presenza del picco wild-type (sia FAM che HEX) a 327 bp ( $\geq 4.500$ RFU) con assenza di picchi $\geq 330$ bp e $\geq 100$ RFU viene refertata come: <b>"Nessuna evidenza di una mutazione ITD del gene FLT3"</b> .
<b>Amplificazione non riuscita:</b>	Mancata presenza di un picco wild-type (327 bp sia per FAM che HEX) di $\geq 4500$ RFU con campioni negativi.
<b>FLT3 D835 Master Mix:</b>	
<b>Positivo:</b>	La presenza del picco mutante a 124 bp o 127 bp (FAM) che sia $\geq 1,0\%$ del picco wild-type a 79 bp viene refertata come: <b>"Rilevamento di una mutazione TKD del gene FLT3"</b> .
<b>Negativo:</b>	La presenza del picco wild-type (FAM) a 79 bp ( $\geq 4500$ RFU) con presenza del mutante $< 1,0\%$ viene refertata come: <b>"Nessuna evidenza di mutazione TKD del gene FLT3"</b> .
<b>Amplificazione non riuscita:</b>	Mancata presenza di un picco wild-type (FAM) di $\geq 4500$ RFU con campioni negativi.

## 9. Limiti della procedura

- Questo saggio non permette di identificare il 100% delle mutazioni attivanti *FLT3*.
- Questo saggio non è in grado di rilevare in modo affidabile meno di 5 cellule positive per 100 cellule normali.
- I risultati dei test molecolari devono sempre essere interpretati nel contesto dei dati clinici, istologici e immunofenotipici.
- I saggi basati su PCR sono soggetti a interferenze dovute alla degradazione del DNA o all'inibizione della PCR a causa della possibile presenza di EDTA, eparina e altri agenti.

## 10. Dimensioni attese dei prodotti amplificati

### 10.1. Dimensioni attese dei prodotti amplificati

Le dimensioni degli ampliconi indicate sono state determinate utilizzando una piattaforma ABI 3500xL. Le dimensioni degli ampliconi osservate sullo specifico strumento per elettroforesi capillare in uso possono differire di 1-4 nucleotidi (nt) rispetto a quelle elencate a seconda della piattaforma di rilevamento e della versione del software di analisi utilizzati. Una volta identificate, le dimensioni degli ampliconi determinate sulla specifica piattaforma in uso saranno omogenee tra le varie corse. Questa riproducibilità è estremamente utile nel monitoraggio della recidiva di malattia.

**NOTA:** "Colore" indica il colore dei prodotti generati con la master mix quando si utilizza l'assegnazione dei colori predefinita sui sistemi di rilevamento della fluorescenza ABI.

**Tabella 8.** Dimensioni attese dei prodotti amplificati per la *FLT3* ITD Master Mix

Master mix	Bersaglio	Colore	Campione	Dimensioni del prodotto in nucleotidi
<b>FLT3 ITD</b>	ITD	<b>Blu e verde</b>	Controllo senza template	Nessun picco $> 100$ RFU e maggiore di 50 bp.
		<b>Blu e verde</b>	DNA di controllo negativo <i>FLT3</i>	Picco blu e verde a 327 bp $\geq 4.500$ RFU
		<b>Blu e verde</b>	Controllo positivo <i>FLT3</i> ITD	Picco blu e verde a 327 bp $\geq 4.500$ RFU e un picco blu e verde a 357 bp $\geq 100$ RFU
		<b>Blu e verde</b>	Campione di paziente <i>FLT3</i> ITD negativo	Picco blu e verde a 327 bp $\geq 4.500$ RFU
		<b>Blu e verde</b>	Campioni di pazienti <i>FLT3</i> ITD positivi	Picco blu e verde a $\geq 330$ bp $\geq 100$ RFU. <b>Nota:</b> il picco WT a 327 bp può essere o non essere presente.

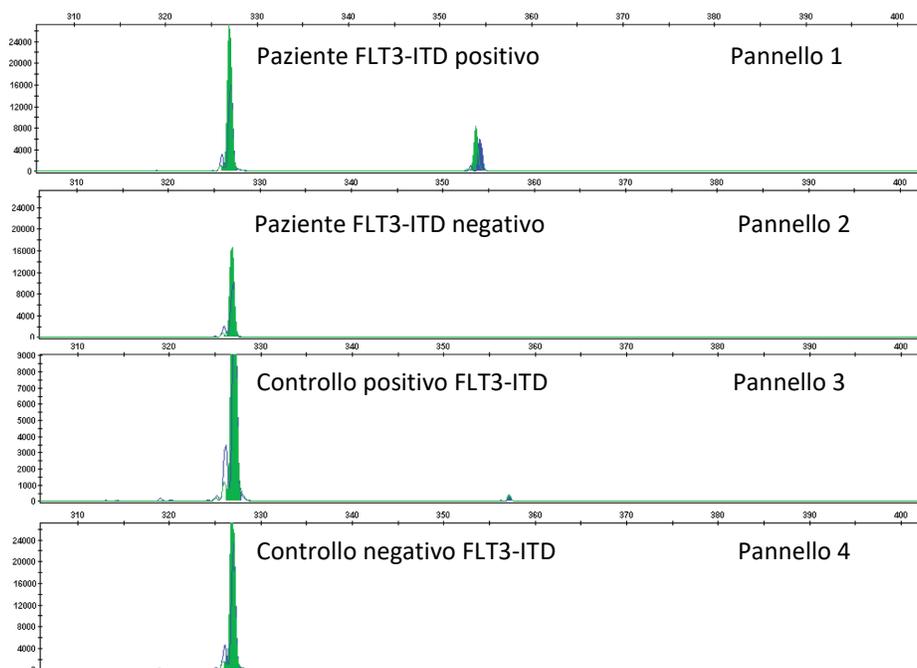
**Tabella 9.** Dimensioni attese dei prodotti amplificati per la *FLT3* TKD Master Mix

Master mix	Bersaglio	Colore	Campione	Dimensioni del prodotto in nucleotidi
<b><i>FLT3</i> D835</b>	TKD	<b>Blu</b>	Controllo senza template	Nessun picco $\geq$ 100 RFU e maggiore di 50 bp.
		<b>Blu</b>	DNA di controllo negativo <i>FLT3</i>	Picco blu a 79 bp $\geq$ 4.500 RFU
		<b>Blu</b>	Controllo positivo <i>FLT3</i> D835	Picco blu a 79 bp $\geq$ 4.500 RFU e un picco blu a 124 bp pari ad almeno l'1% del picco WT
		<b>Blu</b>	Campione di paziente <i>FLT3</i> TKD negativo	Picco blu a 79 bp $\geq$ 4.500 RFU
		<b>Blu</b>	Campioni di pazienti <i>FLT3</i> TKD positivi	Picco blu a 124 bp o 127 bp che sia almeno l'1% del picco WT. <b>Nota:</b> il picco WT a 79 bp può essere o non essere presente.

**Nota sull'interpretazione di TKD:** potrebbero essere presenti alcuni prodotti non digeriti da EcoRV rilevabili come un picco blu a 147 bp. Se viene rilevato solo il picco a 147 bp oppure il picco a 147 bp è  $\geq$  1% del picco WT, l'analisi del campione deve essere ripetuta iniziando dalla fase di amplificazione o dalla fase di digestione con EcoRV.

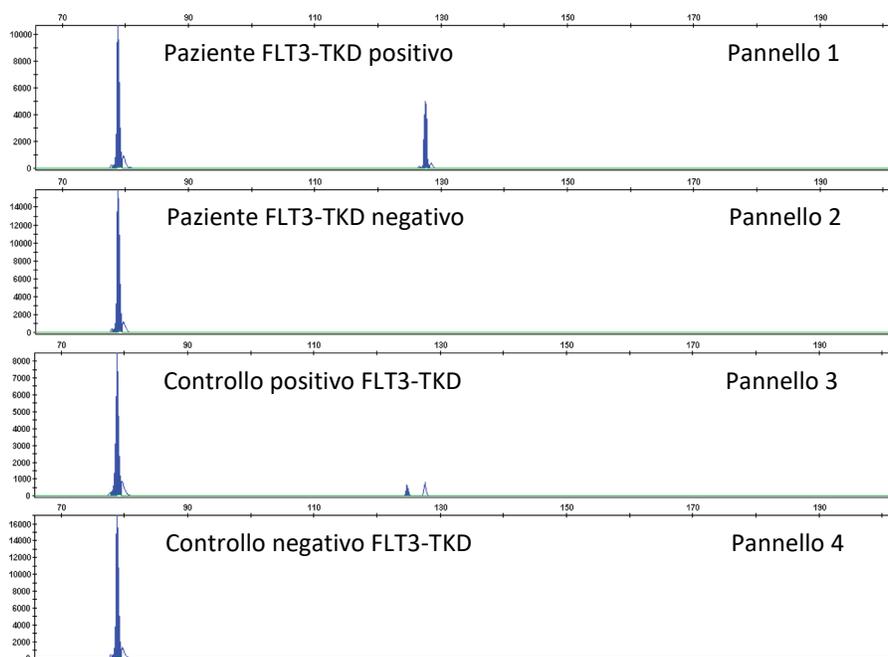
## 10.2. Dati del campione

I dati mostrati di seguito sono stati generati utilizzando le master mix indicate. L'analisi dei prodotti amplificati è stata effettuata su uno strumento ABI 3500xL.



**Figura 2.** Per la *FLT3* ITD Master Mix:

- Il pannello 1 visualizza i dati generati analizzando un campione di paziente positivo.
- Il pannello 2 visualizza i dati generati analizzando un campione di paziente negativo.
- Il pannello 3 visualizza i dati generati analizzando il campione di controllo positivo.
- Il pannello 4 visualizza i dati generati analizzando il campione di controllo negativo.



**Figura 3.** Per la *FLT3* D835 Master Mix:

- Il pannello 1 visualizza i dati generati analizzando un campione di paziente positivo.
- Il pannello 2 visualizza i dati generati analizzando un campione di paziente negativo.
- Il pannello 3 visualizza i dati generati analizzando il campione di controllo positivo.
- Il pannello 4 visualizza i dati generati analizzando il campione di controllo negativo.

## 11. Caratteristiche prestazionali

La validazione del LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 dimostra che il saggio è in grado di rilevare mutazioni ITD e TKD di *FLT3* con una concordanza  $\geq 90\%$  rispetto al sistema di sequenziamento Roche® 454. Nello studio di validazione è stata verificata la capacità del saggio di identificare mutazioni di *FLT3* valutando contemporaneamente l'impatto dell'esecuzione da parte di vari operatori, dell'uso di vari lotti di reagenti e strumenti ABI 3500xL e della realizzazione dell'analisi in giorni non consecutivi. La PPA e la NPA per i campioni clinici e i campioni positivi e negativi preparati artificialmente sono state superiori al 90% tra il LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 e i risultati del sistema di sequenziamento 454.

### 11.1. Riepilogo dei dati

I campioni *FLT3* ITD preparati artificialmente erano costituiti da un campione ITD positivo al 5%, un campione ITD positivo al 50% e un campione ITD negativo. Ciascun campione preparato artificialmente è stato analizzato in triplicato da parte di due operatori diversi che hanno utilizzato due lotti diversi di master mix nel corso di 5 giorni non consecutivi, producendo un totale di 60 replicati per ciascun campione. Complessivamente, 10 campioni clinici sono stati analizzati in singolo da parte di due operatori diversi che hanno utilizzato due lotti diversi di master mix nel corso di 5 giorni non consecutivi, producendo un totale di 20 replicati per ciascun campione. Conformemente al protocollo, le corse con controlli non riusciti non sono state incluse nelle analisi finali. È stata ottenuta una concordanza, rispettivamente, del 100% e del 98% per i campioni preparati artificialmente e per quelli clinici (consultare la Tabella 10). I controlli positivi e negativi non sono stati inclusi nei calcoli. Il campione clinico ITD-6 è stato classificato erroneamente in 4 dei 20 replicati.

**Tabella 10.** Dimensioni dei campioni ITD e concordanza dei campioni con il sistema di sequenziamento 454

Campione	Risultato	N	Concordanza %	Commenti
<b>Controllo pos.</b>	Positivo	17	100%	N/A
<b>5% positivo</b>	Positivo	51	100%	N/A
<b>50% positivo</b>	Positivo	51	100%	N/A
<b>ITD-1</b>	Positivo	17	100%	N/A
<b>ITD-3</b>	Positivo	17	100%	N/A
<b>ITD-4</b>	Positivo	17	100%	N/A

**Tabella 10.** Dimensioni dei campioni ITD e concordanza dei campioni con il sistema di sequenziamento 454

Campione	Risultato	N	Concordanza %	Commenti
<b>ITD-5</b>	Positivo	17	100%	N/A
<b>ITD-6</b>	Negativo	4	20%	FAM (picchi HEX 101 - 113 RFU)
	Positivo	13	80%	
<b>ITD-7</b>	Positivo	17	100%	N/A
<b>Controllo neg.</b>	Negativo	17	100%	N/A
<b>Negativo</b>	Negativo	51	100%	N/A
<b>ITD-2</b>	Negativo	17	100%	N/A
<b>ITD-8</b>	Negativo	17	100%	N/A
<b>ITD-9</b>	Negativo	17	100%	N/A
<b>ITD-10</b>	Negativo	17	100%	N/A

I campioni *FLT3* TKD preparati artificialmente erano costituiti da un campione TKD positivo al 5%, un campione TKD positivo al 50% e un campione TKD negativo. Ciascun campione preparato artificialmente è stato analizzato in triplicato da parte di due operatori diversi che hanno utilizzato due lotti diversi di master mix nel corso di 5 giorni non consecutivi, producendo un totale di 60 replicati per ciascun campione. Complessivamente, 10 campioni clinici sono stati analizzati in singolo da parte di due operatori diversi che hanno utilizzato due lotti diversi di master mix nel corso di 5 giorni non consecutivi, producendo un totale di 20 replicati per ciascun campione. È stata ottenuta una concordanza del 100% per i campioni preparati artificialmente e per quelli clinici (consultare la Tabella 11). I controlli positivi e negativi non sono stati inclusi nei calcoli. Tre dei 60 replicati del campione TKD negativo preparato artificialmente hanno presentato un'amplificazione insufficiente e pertanto sono stati esclusi dal set di analisi per la NPA.

**Tabella 11.** Dimensioni dei campioni TKD e concordanza dei campioni con il sistema di sequenziamento 454

Campione	Risultato	N	Concordanza %	Commenti (discrepanze)
<b>Controllo pos.</b>	Positivo	20	100%	N/A
<b>5% positivo</b>	Positivo	60	100%	N/A
<b>50% positivo</b>	Positivo	60	100%	N/A
<b>TKD-2</b>	Positivo	20	100%	N/A
<b>TKD-3</b>	Positivo	20	100%	N/A
<b>TKD-4</b>	Positivo	20	100%	N/A
<b>TKD-6</b>	Positivo	20	100%	N/A
<b>TKD-7</b>	Positivo	20	100%	N/A
<b>TKD-10</b>	Positivo	20	100%	N/A
<b>Controllo neg.</b>	Negativo	20	100%	N/A
<b>Negativo</b>	Negativo	57	100%	3/60 (5%) non si sono amplificati a sufficienza
<b>TKD-1</b>	Negativo	20	100%	N/A
<b>TKD-5</b>	Negativo	20	100%	N/A
<b>TKD-8</b>	Negativo	20	100%	N/A
<b>TKD-9</b>	Negativo	20	100%	N/A

## 11.2. Analisi dei dati

Per i campioni *FLT3* ITD negativi noti non è stato ottenuto nessun risultato discordante (concordanza di 119/119), con una conseguente NPA del 100% (consultare la Tabella 12).

Per i campioni *FLT3* ITD positivi noti sono stati ottenuti 4 risultati discordanti (concordanza di 200/204), con una conseguente PPA del 98,0% (consultare la Tabella 12). Il campione clinico ITD-6 era un campione *FLT3* ITD positivo noto in base al sistema di sequenziamento 454, tuttavia 4 dei 20 replicati analizzati con il LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 hanno restituito risultati negativi.

**Tabella 12.** Percentuale di concordanza di ITD con il sistema di sequenziamento 454

Percentuale di concordanza		N. di discordanze	N. di concordanze	*95% LL
<b>NPA</b>	100%	0	119	96,9%
<b>PPA</b>	98,0%	4	200	95,1%

\*Per il 95% dei risultati sarebbe prevista una concordanza con il sequenziamento a un tasso superiore o uguale al limite inferiore (LL).

Per i campioni *FLT3* TKD negativi noti, non è stato registrato nessun risultato discordante (137/137), con una conseguente NPA del 100% (consultare la Tabella 13) tra i risultati del sistema di sequenziamento 454 e il LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0.

Per i campioni *FLT3* TKD positivi noti, non è stato registrato nessun risultato discordante (240/240), con una conseguente PPA del 100% (consultare la Tabella 13) tra i risultati del sistema di sequenziamento 454 e il LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0.

**Tabella 13.** Percentuale di concordanza di TKD con il sistema di sequenziamento 454

Percentuale di concordanza		N. di discordanze	N. di concordanze	*95% LL
<b>NPA</b>	100%	0	137	96,9%
<b>PPA</b>	100%	0	240	98,5%

\*Per il 95% dei risultati sarebbe prevista una concordanza con il sequenziamento a un tasso superiore o uguale al limite inferiore (LL).

Il tasso di accettabilità globale dell'analisi per *FLT3* ITD e *FLT3* TKD è risultato pari, rispettivamente, all'85% e al 100%. I tassi di validità dei singoli campioni per ITD e TKD sono stati, rispettivamente, dell'85% e del 99,2%.

### 11.3. Conclusione

La presente validazione dimostra che il LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay 2.0 è in grado di rilevare mutazioni ITD di *FLT3* e mutazioni TKD di *FLT3* con una concordanza minima del 90% rispetto al sistema di sequenziamento 454.

## 12. Bibliografia

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. Assistenza tecnica e Assistenza clienti

### Contatti



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | Stati Uniti d'America

Tel.: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Orario d'ufficio: 7:00 – 17:00 (fuso orario del Pacifico)

Assistenza tecnica: [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com) | Servizio cliente: [sales@invivoscribe.com](mailto:sales@invivoscribe.com) | Sito web: [www.invivoscribe.com](http://www.invivoscribe.com)

Il personale dell'Assistenza tecnica e del Servizio clienti è disponibile dal lunedì al venerdì e può essere contattato per telefono, e-mail o attraverso il sito web.

## 14. Simboli

Sulle etichette dei prodotti diagnostici Invivoscribe sono utilizzati i seguenti simboli.

	Numero di catalogo		Data di scadenza
	Volume del reagente		Rappresentante autorizzato nella Comunità europea
	Numero di lotto		Consultare le istruzioni per l'uso
	Condizioni di conservazione		Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Identificatore Dispositivo Univoco		Produttore
	Conformità Britannica Valutata		Persona responsabile nel Regno Unito
	Rappresentante Autorizzato per la Svizzera		Conformità Europea

## 15. Avviso legale

Questo prodotto è un prodotto diagnostico *in vitro*; non disponibile per la vendita o l'uso in Nord America.

### 15.1. Garanzia e Responsabilità

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) si impegna a fornire prodotti della massima qualità. Invivoscribe® garantisce che i prodotti soddisfano o superano gli standard di prestazione descritti nelle Istruzioni per l'uso, per i prodotti con tale inserto. Se un prodotto è coperto dalle specifiche del prodotto e non funziona come specificato, la nostra politica prevede la sostituzione del prodotto o l'accredito dell'intero prezzo di acquisto. Invivoscribe® non fornisce altre garanzie di alcun tipo, esplicite o implicite. La responsabilità di Invivoscribe® non può eccedere il prezzo di acquisto del prodotto. Invivoscribe non sarà responsabile per eventuali danni diretti, indiretti, consequenziali o incidentali derivanti dall'uso, dai risultati dell'uso o dall'impossibilità di utilizzare i suoi prodotti; L'efficacia del prodotto in condizioni controllate dall'Acquirente nel laboratorio dell'Acquirente deve essere stabilita e continuamente monitorata attraverso processi definiti e controllati dall'Acquirente inclusi, ma non limitati a, test di controllo positivi, negativi e in bianco convalidati internamente ogni volta che un campione viene analizzato. L'ordine, l'accettazione e l'uso del prodotto costituiscono l'accettazione da parte dell'Acquirente della responsabilità esclusiva di garantire l'efficacia del prodotto e l'accettazione da parte dell'Acquirente della limitazione di responsabilità di cui al presente paragrafo.

### 15.2. Brevetti e marchi

Molti di questi prodotti richiedono metodi di amplificazione degli acidi nucleici come la reazione a catena della polimerasi (PCR). Nessuna licenza ai sensi di questi brevetti per l'uso di processi di amplificazione o enzimi è espressamente o implicitamente concessa all'acquirente mediante l'acquisto di questo prodotto.

©2023 Invivoscribe, Inc. Tutti i diritti riservati. I marchi citati nel presente documento sono di proprietà di Invivoscribe, Inc. e/o delle sue affiliate o (come per i marchi di altri utilizzati nel presente documento) dei rispettivi proprietari.