

Instrucciones de uso

CE UK
CA IVD

LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay

Para la detección de mutaciones por duplicación interna en tándem (DIT) y en el dominio tirosina cinasa (DTC) del gen de la tirosina cinasa 3 similar a FMS (*FLT3*).

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*.



Número de catálogo

Productos

Cantidad

REF

K4120291

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

33 reacciones

Índice

1. MARCA COMERCIAL.....4

2. USO PREVISTO4

3. GLOSARIO4

4. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA.....4

5. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO5

5.1. Mutaciones por duplicación interna en tándem (DIT) de FLT3 5

5.2. Mutaciones del dominio tirosina cinasa (DTC) de FLT3 6

6. REACTIVOS Y MATERIALES.....7

7. INSTRUMENTOS/ACCESORIOS 10

7.1. Software (suministrado)10

8. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES 11

8.1. Seguridad cibernética11

9. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS..... 12

9.1. Precauciones12

9.2. Sustancias que pueden afectar a la PCR.....12

9.3. Requisitos y manipulación de las muestras12

10. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA..... 13

10.1. Inspección de la muestra13

10.2. Preparación para el procesamiento de la muestra.....13

10.3. Dilución de las muestras clínicas13

10.4. Aislamiento de células mononucleares (CMN).....13

10.5. Recuento de células mononucleares14

10.6. Preparación de las muestras para extracción de ADN y finalización del aislamiento.....14

10.7. Preparación de la estación de automatización QIAcube.....14

10.8. Extracción del ADN15

10.9. Cuantificación y dilución del ADN15

10.10. Amplificación16

10.11. Digestión con la enzima de restricción (solo para mutados en el DTC).....17

10.12. Detección mediante electroforesis capilar18

10.13. Preparación de la solución patrón, si es necesaria.....19

10.14. Preparación de la placa de muestras.....19

10.15. Configuración de PlateMapper con el software (software) LeukoStrat CDx FLT321

10.16. Configuración del software del equipo 3500xL29

10.17. Desarrollo en el analizador genético 3500xL.....31

10.18. Análisis de datos con el software GeneMapper.....31

10.19. Análisis de datos con el software (software) LeukoStrat CDx FLT3.....33

11. CONTROL DE CALIDAD..... 39

11.1. Validez del desarrollo39

11.2. Control de extracción y validez de las muestras.....39

12. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 40

13. REPETICIÓN DE LA PRUEBA 41

13.1. Desarrollos no válidos41

13.2. Control de extracción no válido en desarrollos válidos41

13.3. Muestras no válidas en desarrollos válidos41

13.4. Códigos de error y repetición de la prueba.....41

13.5. Varios errores en un mismo desarrollo45

13.6. Cambio de colorante.....46

14. LIMITACIONES DE PROCEDIMIENTO 47

15. VALORES ESPERADOS..... 47

15.1.	Tamaño previsto de los productos amplificados.....	47
16.	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO NO CLÍNICO.....	47
16.1.	Todo el conjunto evaluable	48
16.2.	Sensibilidad analítica: límite del blanco (LB).....	50
16.3.	Sensibilidad analítica	50
16.4.	Precisión.....	52
16.5.	Reproducibilidad entre operarios (estirpes celulares).....	52
16.6.	Reproducibilidad entre operarios (muestras clínicas)	52
16.7.	Reproducibilidad entre lotes y entre instrumentos.....	53
16.8.	Sustancias interferentes: exógenas.....	53
16.9.	Sustancias interferentes: endógenas.....	53
16.10.	Sustancias interferentes: fármacos.....	54
16.11.	Transferencia y contaminación cruzada	54
16.12.	Aportaciones de ADN.....	54
17.	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO CLÍNICO	55
17.1.	Perspectiva general del estudio fundamental de transferencia (IVS-002-001).....	55
17.2.	Objetivos del estudio (IVS-002-001).....	55
17.3.	Población de pacientes (IVS-002-001).....	55
17.4.	Selección de pacientes y muestras para la prueba CDx de <i>FLT3</i> (IVS-002-001)	55
17.5.	Análisis de la seguridad (IVS-002-001)	55
17.6.	Eficacia (IVS-002-001)	56
17.7.	Eficacia en la población (EC+, CDx+) (489 sujetos) (IVS-002-001)	57
17.8.	Conclusiones (IVS-002-001)	58
17.9.	Perspectiva general del estudio (IVS-056-001).....	58
17.10.	Objetivos del estudio (IVS-056-001).....	58
17.11.	Población de pacientes (IVS-056-001).....	58
17.12.	Selección de muestras para las pruebas del método de referencia (IVS-056-001).....	58
17.13.	Análisis de la seguridad (IVS-056-001)	59
17.14.	Eficacia (IVS-056-001)	59
17.15.	Conclusiones (IVS-056-001)	60
18.	BIBLIOGRAFÍA	60
19.	SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE	60
20.	SÍMBOLOS	61
21.	AVISO LEGAL.....	61

1. Marca comercial

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

2. Uso previsto

La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay contiene un kit de diagnóstico *in vitro* por PCR diseñado para detectar duplicaciones internas en tándem (DIT) y mutaciones D835 y I836 en el dominio tirosina cinasa (DTC) del gen *FLT3* en ADN genómico extraído de células mononucleares procedentes de sangre periférica o aspirados de médula ósea de pacientes con diagnóstico de leucemia mielógena aguda (LMA).

En los países en los que está autorizada la midostaurina, la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se utiliza como auxiliar para la evaluación de pacientes con LMA para los que es factible el tratamiento con RYDAPT® (midostaurina).

En los países en los que está autorizado el gilteritinib fumarato, la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se utiliza como auxiliar para la evaluación de pacientes con LMA para los que es factible el tratamiento con XOSPATA® (gilteritinib fumarato).

3. Glosario

Software LeukoStrat CDx para <i>FLT3</i>	Software de análisis de los datos derivados de la LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Mutation Assay.
Mutación por duplicación interna en tándem (DIT)	La duplicación e inserción de una parte del gen <i>FLT3</i> en la región yuxtamembrana del gen <i>FLT3</i> .
CE	Control de extracción
CSM	Control sin molde
CP	Control positivo
Relación de la señal (RS)	Se calcula dividiendo el área del pico mutado entre el área del pico sin mutar.
Mutación del dominio tirosina cinasa (DTC)	Cambios en ciertos nucleótidos que dan lugar a cambios en los codones 835 o 836; estos se detectan mediante la inactivación del sitio de digestión con EcoRV del dominio tirosina cinasa del gen <i>FLT3</i> .

4. Resumen y explicación de la prueba

Por lo general, la leucemia mielógena aguda (LMA) tiene un mal pronóstico. La evaluación del estado mutacional del gen del receptor *FLT3* (tirosina cinasa 3 similar a FMS) en la LMA de cariotipo normal es el indicador pronóstico más importante del desenlace de la enfermedad, que habitualmente es sustancial, pues muchos estudios sobre la LMA indican que la presencia de mutaciones activadoras de *FLT3* presagia un mal pronóstico.^{1,2} La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se dirige a las regiones del gen *FLT3* para identificar mutaciones por duplicación interna en tándem (DIT) y mutaciones en el dominio tirosina cinasa (DTC), como las mutaciones D835 e I836. Esta se ha validado en un ensayo clínico internacional.

La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay contiene reactivos, equipos, software y procedimientos para aislar las células mononucleares y extraer el ADN de las muestras de los pacientes, a fin de determinar la presencia de mutaciones en *FLT3*. El ADN se amplifica mediante PCR, el amplicón de DTC se digiere mediante enzimas, los amplicones se detectan mediante electroforesis capilar y el estado mutacional de *FLT3* se determina mediante el software LeukoStrat CDx para *FLT3*. Se considera que existe una mutación por DIT o en el DTC de *FLT3* cuando la relación de la señal mutado-sin mutar se ajusta o supera un valor de corte de 0,05 (consulte el apartado 12, *Interpretación y resultados*). La Figura 1 recoge una representación esquemática de la secuencia de trabajo.

5. Principios del procedimiento

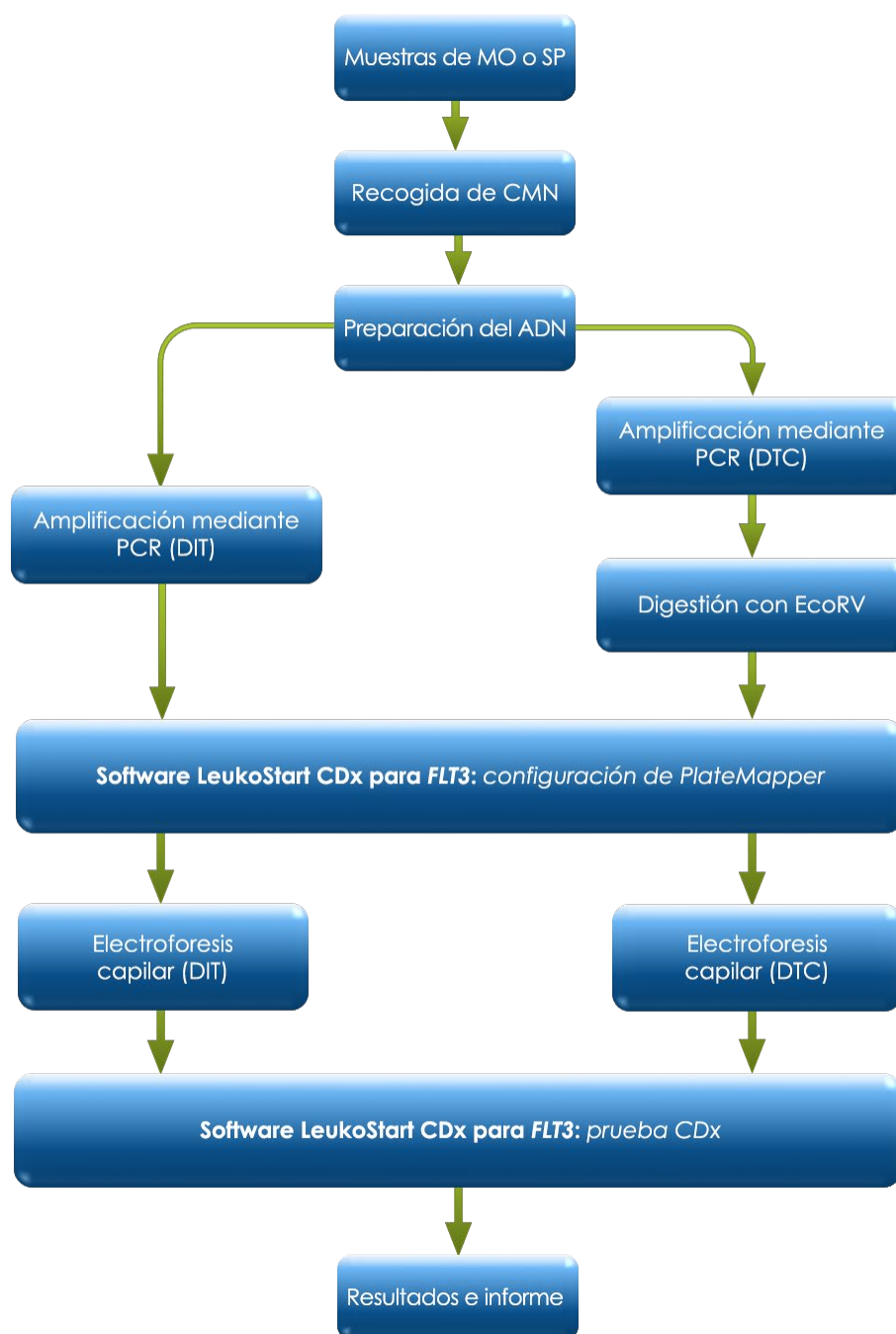


Figura 1: Resumen de la secuencia de trabajo

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

Las mutaciones por DIT de *FLT3* derivan de la duplicación e inserción de una parte del gen *FLT3* en la región yuxtamembrana (YM) del gen *FLT3*. Estas mutaciones varían en materia tanto de localización como de longitud de la secuencia de ADN duplicado insertada. Las mutaciones por DIT dan lugar a la autofosforilación y activación constitutiva de *FLT3*.¹

La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay utiliza los cebadores que se encuentran en la región YM y alrededor de ella. Los cebadores de PCR directos e inversos están marcados con fluorescencia con diferentes fluoróforos que sirven para confirmar la presencia de la señal en la muestra. Los alelos de *FLT3* sin mutar se amplifican y generan un producto de 327 ± 1 pb de acuerdo con la prueba, mientras que los alelos con mutaciones por DIT generan un producto de más de 327 ± 1 pb (Figura 2).

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

Las mutaciones del DTC de *FLT3* derivan de sustituciones y deleciones en el ácido nucleico que dan lugar a cambios en la secuencia de los aminoácidos en el lugar de la catálisis. Las mutaciones del DTC (p. ej., sustituciones y deleciones en D835 e I836) dan lugar a la autofosforilación y la activación constitutiva de *FLT3*.²

Los alelos sin mutar del gen *FLT3* contienen una zona 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 deja de poder identificar y digerir el ADN en dicho sitio. La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay utiliza cebadores situados en la región del DTC. La región diana del *FLT3* se amplifica mediante PCR; a continuación, se realiza la digestión con la enzima de restricción EcoRV. Uno de los cebadores de la PCR está marcado con un fluoróforo; el otro contiene una enzima de restricción EcoRV diseñada para la digestión tanto del alelo sin mutar como del mutado. El patrón de digestión identifica la pérdida de la secuencia génica normal y garantiza la realización de la digestión. Los alelos sin mutar del gen *FLT3* generan productos de digestión de 79 ± 1 pb, mientras que los alelos mutados generan productos de 125 ± 1 pb o 127 ± 1 pb a partir del amplicón original sin digerir de 145 ± 1 pb o 147 ± 1 pb, de acuerdo con esta prueba (Figura 2).

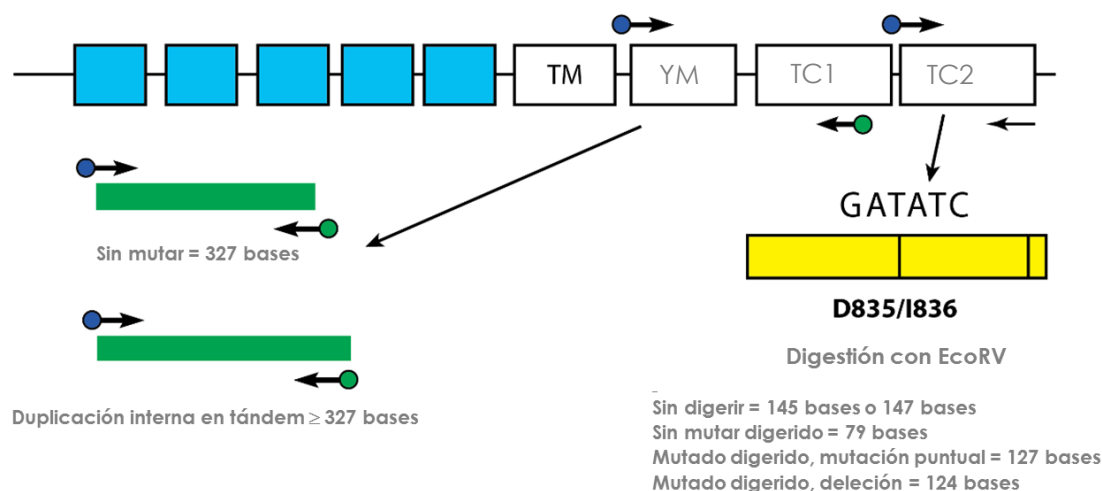


Figura 2: Representa la región yuxtamembrana (YM) de *FLT3* (TM = transmembrana) y el bucle de activación del dominio tirosina cinasa (TC). Las flechas negras representan las posiciones relativas de los cebadores que se dirigen a la región YM (en caso de DIT) o al bucle de activación del dominio cinasa (en caso de DTC). Los puntos coloreados representan los fluoróforos de los cebadores marcados. El cuadro amarillo contiene líneas verticales negras que representan la posición de las zonas de digestión con la enzima de restricción EcoRV.

6. Reactivos y materiales

NOTA: La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay puede utilizarse hasta alcanzar la fecha de caducidad indicada si se conserva según se recoge en la tabla 1.

Tabla 1: Lista de reactivos de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, [REF](#) K4120291

Número de catálogo	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento	Cant. por unidad	Núm. de unidades/kit
REF R0880080**	<i>FLT3</i> ExtractionControl (Control de extracción de <i>FLT3</i>)		1800 µl/frasco	1 frasco
REF B4120051*	<i>FLT3</i> ITD MasterMix (Mezcla maestra: DIT para <i>FLT3</i>)		1500 µl/frasco	1 frasco
REF B4120061*	<i>FLT3</i> TKD Master Mix (Mezcla maestra: DTC para <i>FLT3</i>)		1500 µl/frasco	1 frasco
REF R0880060**	<i>FLT3</i> ITD Positive Control (Control positivo: DIT para <i>FLT3</i>)		100 µl/frasco	1 frasco
REF R0880070**	<i>FLT3</i> TKD Positive Control (Control positivo: DTC para <i>FLT3</i>)		100 µl/frasco	1 frasco
REF R0930020**	<i>FLT3</i> No TemplateControl (Control sin molde para <i>FLT3</i>)		200 µl/frasco	1 frasco

*Los frascos de mezclas maestras, una vez abiertos, pueden someterse hasta a 4 ciclos de congelación y descongelación.

**Los frascos de controles, una vez abiertos, pueden someterse hasta a 8 ciclos de congelación y descongelación.

Tabla 2: Reactivos, materiales y equipos adicionales necesarios (no suministrados), número de catálogo para la UE

Reactivo o material	Reactivo o material recomendado y proveedor	Número de catálogo	Notas
ADN polimerasa	Roche: DNA Polymerase (ADN polimerasa) EagleTaq	05206944190	N. P.
Pipetas calibradas	Sartorius: - eLINE® Single Channel (monocanal), de 5-120 µl - eLINE® 8 Channel (de ocho canales), 0,2-10 µl o equivalente Gilson: - Pipetas P-2M, P-10N, P-20N, P100N, P-200N y P-1000N o equivalentes	N. P.	Deben ser capaces de medir con precisión volúmenes de entre 0,5 µl y 1000 µl
Termociclador	Thermo Fisher Scientific: 96-Well Thermal Cycler (termociclador de 96 pocillos) Veriti™ Dx	4452300	N. P.
Reactivos para la endonucleasa EcoRV	New England Biolabs: 20 000 unidades/ml de EcoRV	R0195S O R0195L	Se incluye la cantidad necesaria de NEBuffer™ r3.1 con la compra de EcoRV.
Agitador vorticial	N. P.	N. P.	N. P.
Placas o tubos para PCR	N. P.	N. P.	Placas esterilizadas y con faldones
Puntas de pipeta con barrera de filtro	N. P.	N. P.	Estériles y exentas de RNasa, DNasa y pirógenos
Microcentrífuga	N. P.	N. P.	N. P.

Tabla 2: Reactivos, materiales y equipos adicionales necesarios (no suministrados), número de catálogo para la UE

Reactivo o material	Reactivo o material recomendado y proveedor	Número de catálogo	Notas
Instrumento y software para electroforesis capilar de Thermo Fisher Scientific	Thermo Fisher Scientific: • Genetic Analyzer series (Analizador genético de la serie) 3500xL	4440467	Este instrumento no tiene el marcado CE.
	Software (Software) GeneMapper® v4.1.x	4366925	N. P.
Formamida Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: • Formamide (Formamida) Hi-Di™	4401457	N. P.
Patrones de tamaño LIZ	Thermo Fisher Scientific: • Dye Size Standard v2.0 (Patrón de tamaño v2.0) GeneScan™ 600 LIZ™	4408399	N. P.
Colorante G5 para calibración espectral	Thermo Fisher Scientific: • Matrix Standard Kit (Dye Set G5) (Kit de patrones para matriz [colorante G5]) DS-33	4345833	Colorante utilizado para la calibración espectral del instrumento 3500xL
Polímero	Thermo Fisher Scientific: • Polymer (Polímero) POP-7™ para Genetic Analyzers (Analizadores genéticos) 3500/3500xL	4393708	N. P.
Solución amortiguadora	Thermo Fisher Scientific: • Anode Buffer Container (ABC) (Contenedor de amortiguación anódica [CAA]), series (serie) 3500	4393927	N. P.
	Thermo Fisher Scientific: • Cathode Buffer Container (CBC) (Contenedor de amortiguación catódica [CAC]), series (serie) 3500	4408256	N. P.
Matriz de capilares	Thermo Fisher Scientific: • Genetic Analyzer 24-Capillary Array 50 cm (Matriz de 24 capilares de 50 cm para el analizador genético) 3500xL	4404689	N. P.
Membranas de goma	Thermo Fisher Scientific: • Septa Cathode Buffer Container (Membrana de goma para el contenedor de amortiguación catódica) (serie 3500 de los analizadores genéticos)	4410715	N. P.
	Thermo Fisher Scientific: • Septa (Membrana de goma) para los Genetic Analyzers, 96 well (analizadores genéticos, 96 pocillos) 3500/3500xL	4412614	N. P.
Retenedor y base del analizador 3500xL de Thermo Fisher Scientific	Thermo Fisher Scientific: • 96 Well Standard Retainer & Base Set (Retenedor y base para 96 pocillos), series (serie) 3500	4410228	N. P.
Lámina de aluminio para placas de 96 pocillos	N. P.	N. P.	N. P.
Tiras de 96 pocillos y 8 tapas	N. P.	N. P.	N. P.
Agua de calidad USP o para biología molecular desionizada y destilada en vidrio	N. P.	N. P.	Estéril y exenta de RNasa y DNasa

Tabla 2: Reactivos, materiales y equipos adicionales necesarios (no suministrados), número de catálogo para la UE

Reactivo o material	Reactivo o material recomendado y proveedor	Número de catálogo	Notas
Extracción de ADN	Qiagen: DSP DNA Blood Mini Kit (Minikit de ADN en sangre DSP) QIAamp®	61104	Incluye una serie de soluciones amortiguadoras (AL, AW1, AW2 y AE), disolvente para proteasas, proteasa, tubos de elución y columnas de centrifugación
Aislamiento de células mononucleares	Medio para gradiente de densidad	N. P.	Densidad: 1,077 g/ml
Solución salina amortiguada	Mediatech Inc. (Corning): Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (Solución salina amortiguada con fosfato [SSAFD]) de Dulbecco	21-031-CV	N. P.
Medio de crecimiento	Mediatech Inc. (Corning): RPMI 1640 con L-glutamine (L-glutamina)	10-040-CV	N. P.
Contador de células	N. P.	N. P.	N. P.
Espectrofotómetro UV de microvolúmenes	N. P.	N. P.	Capaz de determinar la absorbancia a 260 nm para el cálculo de la concentración del ácido nucleico
Alcohol etílico/etanol	N. P.	N. P.	Etanol 200 y anhidro absoluto, de calidad ACS/USP
Extractor de ADN	QIAgen: System (Sistema) QIAcube (110 V)	9001882	N. P.
Frascos de reactivo extractor de ADN	QIAgen: Reagent Bottles, 30 mL (6) (Frascos de reactivo, 30 ml [6])	990393	N. P.
Soporte de frascos de reactivo extractor de ADN	QIAgen: Reagent Bottle Rack (Soporte de frascos de reactivo)	990390	N. P.
Adaptador del rotor del extractor de ADN y soporte	QIAgen: - Rotor Adapters (Adaptadores del rotor) (10 × 24) - Rotor Adapter Holder (Soporte del adaptador del rotor)	990394 990392	N. P.
Placas para electroforesis capilar, con faldón	Life Technologies: Optical 96-Well Reaction Plate (Placa de reacción de 96 pocillos) MicroAmp Optical	4316813	N. P.

*El número de catálogo que figura en la tabla 2 es aplicable únicamente a la Unión Europea. Póngase en contacto con el proveedor de su zona para conocer el número equivalente para su región.

Tabla 3: Materiales generales de laboratorio (no suministrados)

Descripción de los materiales
Tubos cónicos de 15 ml
Tubos cónicos de 50 ml
Pipetas serológicas de 5 ml, 10 ml y 25 ml

Tabla 3: Materiales generales de laboratorio (no suministrados)

Descripción de los materiales
Toallitas sin pelusa
Cronómetro calibrado
Desinfectante QIAcube, del tipo Steris Coverage
Cubo de hielo y hielo
Recipiente para desechos líquidos
Tubos de superficie no aglutinante del volumen adecuado para diluciones y alícuotas de ADN
Tubos del volumen adecuado para SSAFD, PCR y mezcla maestra para digestión
Tubos de muestras QIAcube
Tapones de rosca para tubos de muestras QIAcube
Pipetas de transferencia desechables
Puntas de pipeta

7. Instrumentos/accesorios

NOTA: Mantenga los equipos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- Nevera capaz de conservar a entre 2 °C y 8 °C
- Congelador capaz de conservar a entre –30 °C y –15 °C
- Campana de laboratorio
- Pipeta electrónica
- Pipeta repetidora
- Pipetas multicanal, manuales y electrónicas
- Centrífuga capaz de alcanzar 1000 × g con rotor giratorio y refrigeración
- Centrífuga capaz de alcanzar 1400 × g con rotor giratorio
- Los instrumentos y accesorios anteriores no se suministran

7.1. Software (suministrado)

7.1.1. **REF:** K4120281 (software (software) LeukoStrat CDx *FLT3*, v1.1.x.IVD)

Para validar el uso del software LeukoStrat, se configuró la pantalla de acuerdo con una resolución de 1920 × 1200 píxeles, mediante la configuración “Más pequeño: 100%”. Si se utilizan otras resoluciones, podría haber problemas de visualización.

7.1.1.1. Requisitos del equipo:

- Sistema operativo: es necesario disponer de Windows™ 10
- Procesador: se recomienda disponer de una CPU con Intel Core 2 Duo o una versión más reciente
- RAM: 4 GB como mínimo
- Espacio disponible en disco: 5 GB como mínimo
- Unidad de CD-ROM
- Adobe Acrobat Reader 2018, 2019, 2020, o 2021

7.1.2. Si su centro utiliza el conjunto de caracteres Latín-1, ignore la sección 7.1.2. Si su centro utiliza caracteres distintos a los del conjunto de caracteres Latín-1, lea las instrucciones siguientes antes de instalar el LeukoStrat CDx *FLT3* Software v1.1.2.IVD.

7.1.3. Si el conjunto de caracteres que utiliza no es Latín-1 se recomienda instalar el LeukoStrat CDx *FLT3* Software v1.1.2.IVD en una estación de trabajo por separado.

7.1.3.1. El software LeukoStrat CDx *FLT3* Software v1.1.2.IVD requiere que la configuración regional del sistema operativo Microsoft Windows 10 se establezca en «Inglés (Estados Unidos)» u otra configuración regional que use el conjunto de caracteres Latín-1.

7.1.3.2. Para cambiar la configuración regional:

- 7.1.3.2.1 Abra el menú **Inicio** y teclee **Panel de control**. Haga clic en **Panel de control** para abrirlo.
- 7.1.3.2.2 Seleccione **Región** o **Reloj y región** > **Región** y haga clic en la pestaña Administrativo.

7.1.3.2.3 Haga clic en el icono **Cambiar configuración regional del sistema...** y cambie el idioma seleccionado a «Inglés (Estados Unidos)».

7.1.3.2.3.1 Si hay una opción beta para la compatibilidad de idioma en todo el mundo, deje la casilla sin marcar.

7.1.3.3. Tenga en cuenta que cambiar la configuración regional puede provocar que otro software instalado en la estación de trabajo con LeukoStrat CDx *FLT3* Software v1.1.2.IVD no funcione correctamente. Si esto provoca que otro software funcione mal, vuelva a cambiar la configuración regional a la configuración original cuando lo vaya a utilizar.

8. Advertencias y precauciones



Lea atentamente las instrucciones de uso antes de comenzar la prueba y siga cada paso atentamente.

- **DIV** Producto para uso diagnóstico *in vitro*.
- Realizar diluciones, reducciones de volumen de las reacciones de amplificación y otras desviaciones de este protocolo pueden afectar al rendimiento de la prueba y anular cualquier sublicencia limitada que se obtenga con la compra de este kit de análisis. No mezcle ni combine reactivos de kits con diferentes números de lote.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- Elimine los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con las normativas nacionales, regionales y locales.
- Anote el número de ciclos de congelación y descongelación.
- Utilice el equipo de protección individual (guantes, bata y gafas de protección) habitual para realizar tareas analíticas. Utilice prácticas óptimas de laboratorio y siga las precauciones básicas necesarias para trabajar con muestras. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo del laboratorio. Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos de la prueba. Manipule las muestras en instalaciones aprobadas de contención de seguridad biológica y ábralas solo en campanas de seguridad biológica certificadas.
- Dado que se trata de una prueba de sensibilidad analítica, debe ser extremadamente cauteloso para evitar la contaminación de los reactivos o mezclas de amplificación con muestras, material de referencia o material amplificado. Use puntas de pipeta nuevas y resistentes a aerosoles entre muestras y reactivos de dispensación. Preste mucha atención a los reactivos para detectar posibles signos de contaminación (p. ej., controles negativos con señales positivas). Elimine los reactivos sospechosos de contaminación.
- Para reducir al mínimo la contaminación, use guantes limpios cuando manipule muestras y reactivos y limpie de manera regular las zonas de trabajo y las pipetas antes de realizar la PCR.
- La esterilización por autoclave no elimina la contaminación del ADN. En el laboratorio de PCR, siga una secuencia de trabajo unidireccional entre zonas de trabajo independientes: empiece por la zona de preparación de muestras, siga en la de amplificación y, por último, acceda a la de detección. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para la preparación de las muestras.
- Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica deben ser de uso exclusivo de dicha zona.
- Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación con RNasa y DNasa o la contaminación cruzada.
- Todos los instrumentos y equipos deben mantenerse y calibrarse de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.
- Cuando el recipiente haya alcanzado la temperatura ambiente, examine el interior del cuello de cada recipiente del polímero POP-7. Asegúrese de que el accesorio no contenga restos de polímero secos ni cristalizados. No introduzca el contenido del recipiente en el equipo 3500 si observa cristalización, pues esta podría afectar al rendimiento de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay y del propio equipo 3500. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de ThermoFisher.

8.1. Seguridad cibernética

- Los equipos informáticos y las redes son vulnerables si no se protegen y actualizan de forma activa. Disponer de un buen programa de seguridad para equipos informáticos y redes ayuda a garantizar que los datos no se vean expuestos, se pierdan ni se dañen como consecuencia de riesgos cibernéticos evitables. Equipe todos sus equipos informáticos con un software antivirus, que debe estar actualizado y activo.
- Filtre y asegure el tráfico de red con un firewall.
- Conserve los datos en equipos locales para reducir los riesgos de seguridad cibernética que podrían presentarse al transferir datos sensibles a través de la red.
- Instale el software solo en equipos de usuarios locales para evitar el uso no autorizado de dicho software.

- Asegúrese de que Windows y Adobe Acrobat Reader estén siempre actualizados con los últimos parches de seguridad disponibles.
- Asegúrese de que el lector de PDF predeterminado de Windows sea Adobe Acrobat Reader. Abrir los informes de muestras y ejecución en un navegador podría generar riesgos de seguridad cibernética para los datos de los pacientes.
- El software LeukoStrat CDx *FLT3* ha sido validado con el siguiente software antivirus:
 - Symantec Endpoint Protection Version 14.3
 - McAfee Endpoint Security Version 10.7
 - ESET Endpoint Security Version 9.0

9. Recogida y preparación de las muestras

9.1. Precauciones

Las muestras biológicas procedentes de seres humanos pueden contener materiales potencialmente infecciosos. Manipule las muestras de acuerdo con el programa sobre patógenos de transmisión hemática de su centro y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.

9.2. Sustancias que pueden afectar a la PCR

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

9.3. Requisitos y manipulación de las muestras

- Para realizar la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, es necesario al menos 1 ml de sangre periférica y 0,25 ml de médula ósea anticoagulada con heparina sódica o EDTA.
- Las muestras pueden conservarse a entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 7 días antes del análisis.
- No debe ponerse en riesgo la integridad de los tubos de muestras ni su contenido (es decir, se envían congelados).

10. Procedimiento de la prueba

10.1. Inspección de la muestra

- 10.1.1. Desembale las muestras de sangre periférica (SP) y aspirado de médula ósea (MO) y deseche las muestras que no se ajusten a los requisitos indicados el apartado 9.3.

10.2. Preparación para el procesamiento de la muestra

- 10.2.1. Proceda con el procesamiento de la muestra en un espacio de trabajo reservado para dicha tarea.
- 10.2.2. Pipetee unos 12 ml del medio RPMI-1640 en cada tubo cónico de 50 ml. Deje que el medio alcance la temperatura ambiente durante al menos 1,75 horas.
 - 10.2.2.1. Si el medio RPMI-1640 se vierte frío a los tubos cónicos de 15 ml, déjelo a temperatura ambiente durante al menos 45 minutos.
- 10.2.3. Pipetee 3 ml del gradiente de densidad por muestra en tubos cónicos de 15 ml.
 - 10.2.3.1. Si el gradiente de densidad se ha conservado a entre 2 °C y 8 °C, déjelo 1 hora a temperatura antes de usarlo.
- 10.2.4. Pipetee unos 200 µl de la SSAFD por muestra en tubos del volumen que corresponda y déjelos a temperatura ambiente durante al menos 45 minutos antes de usarlos.

10.3. Dilución de las muestras clínicas

NOTA: El manual recoge las instrucciones de uso del equipo QIAcube de extracción de ADN. Se recomienda usar un equipo QIAcube, pero no es obligatorio. Si utiliza un QIAcube, asegúrese de reservar un espacio para el control de extracción.

- 10.3.1. Mezcle las muestras de los tubos invirtiéndolos de 4 a 6 veces. Pipetee las muestras (de 1 a 3 ml de sangre periférica o de 0,25 a 0,75 ml de médula ósea) en los tubos cónicos de 15 ml.
- 10.3.2. Pipetee el medio RPMI-1640 en las muestras hasta alcanzar un volumen total de 6 ml. Cierre bien los tubos y mezcle invirtiéndolos de 3 a 5 veces o pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que la mezcla sea uniforme.
- 10.3.3. Cualquier muestra sobrante se puede conservar a entre 2 °C y 8 °C.

10.4. Aislamiento de células mononucleares (CMN)

- 10.4.1. Pipetee la muestra diluida de sangre periférica o de médula ósea sobre el gradiente de densidad. Incline el tubo que contiene el gradiente de densidad mientras pipetea lentamente para evitar que se mezclen las capas.
- 10.4.2. Tras pipetear toda la muestra, coloque el tubo en posición vertical y ciérrelo bien.
- 10.4.3. Centrifugue los tubos cónicos de 15 ml en las siguientes condiciones; asegúrese de que el freno esté desconectado:
 - Fuerza = $400 \times g$ (rcf)
 - Tiempo = 30 minutos
 - Temperatura = 20 °C
 - Acel./decel. = mínimas
- 10.4.4. Pipetee 6 ml del medio RPMI-1640 en un tubo cónico de 15 ml por cada muestra por procesar.
- 10.4.5. Tras la centrifugación, utilice una pipeta para aspirar lentamente la capa de CMN o hasta extraer 3 ml.
- 10.4.6. Dispense la suspensión de CMN procedente del tubo cónico de 15 ml que contiene 6 ml del medio RPMI-1640. Tape el tubo y mezcle suavemente invirtiéndolo entre 3 y 5 veces.
- 10.4.7. Centrifugue los tubos cónicos en las siguientes condiciones:
 - Fuerza = $355\text{-}364 \times g$ (rcf)
 - Tiempo = 10 minutos
 - Temperatura = 20 °C
 - Acel./decel. = máximas

- 10.4.8. Vierta el sobrenadante del sedimento celular invirtiendo el tubo solo una vez antes de devolverlo a la posición vertical. Vuelva a suspender el sedimento en el líquido restante golpeando suavemente el tubo de 10 a 15 veces o hasta que el sedimento se vuelva a suspender.
- 10.4.9. Añada 1 ml del medio RPMI-1640 al sedimento de células resuspendido. Tape el tubo y mezcle suavemente golpeando con los dedos de 6 a 8 veces.
- 10.4.10. Coloque los tubos con las muestras en un baño de agua con hielo hasta que hayan finalizado los recuentos de células mononucleares.

10.5. Recuento de células mononucleares

Para contar células mononucleares, utilice un sistema de recuento adecuado. Reduzca al mínimo el volumen consumido en el recuento para garantizar que la cantidad de ADN sea correcta para la prueba.

10.6. Preparación de las muestras para extracción de ADN y finalización del aislamiento

- 10.6.1. Si la concentración indicada es ≤ 5 millones de células/ml, procese todo el volumen de suspensión celular. Consulte el apartado 10.6.3.
- 10.6.2. Si la concentración indicada es > 5 millones de células/ml, calcule un volumen de muestra que contenga 5 millones de células vivas (V_i); las columnas de QIAcube tienen capacidad para ≤ 5 millones de células.
 - 10.6.2.1. Utilice la ecuación $C_i V_i = C_f V_f$ para calcular V_i en cada muestra.
 - C_i = concentración de células (células/ml) a partir del recuento de CMN
 - C_f = concentración final (5 millones de células/ml)
 - V_f = volumen final (1 ml)
 - $V_i = \frac{5\,000\,000 \frac{\text{células}}{\text{ml}} \times 1\,\text{ml}}{C_i}$
 - 10.6.2.2. Utilice la ecuación $V_f - V_i$ para calcular el volumen del medio RPMI-1640 que se debe añadir a V_i para enrasar a 1000 μl .
 - 10.6.2.3. Mezcle los tubos que contienen las muestras de > 5 millones de células/ml dando de 6 a 8 golpecitos en los tubos.
 - 10.6.2.4. Transfiera los volúmenes calculados a un tubo cónico de 15 ml por muestra.
- 10.6.3. Centrifugue los tubos de muestra cónicos de 15 ml que contienen las suspensiones celulares en las siguientes condiciones:
 - Fuerza = $355\text{--}364 \times g$ (rcf)
 - Tiempo = 10 minutos
 - Temperatura = 20°C
 - Acel./decel. = máximas
- 10.6.4. Utilice una pipeta de transferencia para aspirar el sobrenadante del sedimento celular. Podrían quedar restos del medio.
- 10.6.5. Golpee suavemente los tubos cónicos de 15 ml entre 10 y 15 veces o hasta que el sedimento se haya soltado.
- 10.6.6. Añada 200 μl de la SSAFD y mezcle golpeando el tubo de 10 a 15 veces para resuspender las células. Tape las muestras e introdúzcalas en el baño de agua con hielo.

10.7. Preparación de la estación de automatización QIAcube

NOTA: En este manual se recogen las instrucciones de uso de un equipo QIAcube para la extracción de ADN. Se recomienda usar un equipo QIAcube, pero no es obligatorio. La extracción del ADN puede realizarse con el DNA Blood Mini Kit (Minikit de ADN en sangre) Qiagen DSP, sin que sea necesario el equipo QIAcube.

- 10.7.1. Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento que figuran en el manual del fabricante de la Automation Station (estación de automatización) QIAcube, a menos que se indique lo contrario a continuación.
 - 10.7.1.1. Siga las instrucciones de QIAgen para proceder con el mantenimiento de la Automation Station (estación de automatización) QIAcube, con la siguiente excepción: realice la prueba de estanqueidad una vez al mes en lugar de cada seis meses.
- 10.7.2. Prepare la Automation Station (estación de automatización) QIAcube para su uso cargando los materiales y reactivos necesarios.

- 10.7.2.1. La QIAcube es capaz de procesar hasta 12 tubos. Sin embargo, uno de los espacios se reserva al control de extracción (utilizado como control de contaminación de extracción y control negativo de la PCR). No podrá procesar 1 ni 11 tubos por desequilibrio de la centrifuga.
- 10.7.2.2. Pueden utilizarse tubos blancos (con la SSAFD) si el número de extracciones necesarias, incluido el control de extracción, es de 11 tubos.
- 10.7.3. Extraiga un tubo del control de extracción (CE), que debería estar almacenado a entre -30°C y -15°C , y descongélelo a temperatura ambiente. Los tubos de CE pueden volver a meterse en el congelador tras usarse. Anote el número de ciclos de congelación y descongelación.
- 10.7.4. Introduzca el tubo de CE en el agitador vorticial y agite a velocidad máxima durante 5-15 segundos. Centrifugue el tubo durante 2-5 segundos si hay líquido en la tapa. Introduzca 200 μl del control de extracción en un tubo de muestras. El tubo que contiene el CE puede taparse y conservarse a entre 2°C y 8°C hasta que el desarrollo esté listo.

10.8. Extracción del ADN

NOTA: El manual recoge las instrucciones de uso del equipo QIAcube de extracción de ADN. Se recomienda usar un equipo QIAcube, pero no es obligatorio. La extracción del ADN puede realizarse con el DNA Blood Mini Kit (Minikit de ADN en sangre) Qiagen DSP, sin que sea necesario el equipo QIAcube.

- 10.8.1. Pipetee la suspensión celular (consulte el apartado 10.6.6) hacia arriba y hacia abajo entre 4 y 6 veces para resuspender las células. Transfiera la suspensión celular de la SSAFD a los tubos de muestras. Asegúrese de que la mayor parte de la solución se encuentre en el fondo del tubo.
- 10.8.2. Coloque el tubo que contiene la muestra de control de extracción en la última posición del desarrollo.
- 10.8.3. Cargue los demás tubos de muestras, los reactivos y la solución que contiene la proteasa en el equipo.
- 10.8.4. Inicie el desarrollo y asegúrese de seleccionar los siguientes parámetros.
 - 10.8.4.1. Utilice el protocolo del DNA Blood Mini (minikit de ADN en sangre) QIAamp.
 - 10.8.4.2. Seleccione **Blood (Sangre)** o **Body fluid (Humor corporal)** como material inicial.
 - 10.8.4.3. Ajuste el *Elution volume (Volumen de elución)* en **100 μl** .
- 10.8.5. Cuando haya finalizado la extracción, tape los tubos de muestras de ADN y consérvelos a entre 2°C y 8°C hasta que se haya realizado la cuantificación.

10.9. Cuantificación y dilución del ADN

- 10.9.1. Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento que figuran en el manual del fabricante del espectrofotómetro UV de microvolúmenes, a menos que se indique lo contrario a continuación.
- 10.9.2. Introduzca los tubos de muestras de ADN en el agitador vorticial y agite a velocidad máxima durante 5-15 segundos. Centrifugue de 2 a 5 segundos en la microcentrífuga los tubos de muestras de ADN para eliminar el líquido de las tapas.
- 10.9.3. Realice una prueba en blanco con 2 μl de la solución amortiguadora AE.
- 10.9.4. Lea 2 μl de cada muestra de ADN.
- 10.9.5. Si la lectura de la concentración de la muestra de ADN es $\leq 9,4 \text{ ng}/\mu\text{l}$, vuelva a cuantificar la muestra de ADN dos veces más con 2 μl más. Asegúrese de que la muestra se mezcle bien para evitar lecturas imprecisas del espectrofotómetro UV de microvolúmenes. La media de las tres lecturas es la concentración final de ADN.

NOTA: Si el valor final de la cuantificación es $\leq 9,4 \text{ ng}/\mu\text{l}$, la muestra de ADN no puede analizarse con la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Vuelva a procesar la muestra para obtener una cantidad de ADN adecuada.

NOTA: Si el valor final de la cuantificación del control de extracción es $\leq 9,4 \text{ ng}/\mu\text{l}$, las muestras de ADN asociadas no pueden analizarse con la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Vuelva a procesar las muestras para obtener una cantidad de ADN adecuada.

- 10.9.6. Las muestras de ADN pueden conservarse sin diluir a entre -30°C y -15°C durante un año como máximo. Las muestras de ADN sin diluir o diluidas a 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ pueden conservarse a entre 2°C y 8°C durante 7 días como máximo.

NOTA: El ADN sin diluir puede exponerse a un máximo de 5 ciclos de congelación y descongelación.

- 10.9.7. Las muestras de ADN con una concentración $\geq 10,5$ ng/ μ l deben diluirse hasta alcanzar los 10 ng/ μ l en una solución amortiguadora AE. Utilice la ecuación $C_i V_i = C_f V_f$ para calcular V_i tras seleccionar el volumen final (V_f) a partir de la Tabla 4.

- $V_i = \frac{(V_f \times 10 \frac{ng}{\mu l})}{C_i}$
- C_i = Concentración de ADN de acuerdo con el espectrofotómetro UV de microvolúmenes
- C_f = Concentración final de ADN (10 ng/ μ l)
- V_i = Volumen de ADN sin diluir que se debe diluir
- V_f = Volumen final de ADN diluido (de acuerdo con la tabla 4)
- $V_f - V_i$ = Cantidad de la solución amortiguadora AE que debe añadirse a V_i

Tabla 4: Determinación de los volúmenes finales mediante el valor de cuantificación

Concentración de ADN de acuerdo con el espectrofotómetro UV de microvolúmenes (C_i)	Volumen final (V_f)
$C_i \leq 9,4$ ng/ μ l	No apto para análisis
$9,5 \leq C_i \leq 10,4$ ng/ μ l	Analizar tal cual
$10,5 \leq C_i \leq 50,4$ ng/ μ l	35 μ l
$50,5 \leq C_i \leq 200,4$ ng/ μ l	100 μ l
$C_i \geq 200,5$ ng/ μ l	180 μ l

10.10. Amplificación

NOTA: Para el desarrollo de DIT o DTC, siga las instrucciones que figuran en este apartado el mismo día.

NOTA: Reduzca al mínimo la exposición de las mezclas maestras a la luz.

NOTA: Reduzca al mínimo el tiempo de conservación de Taq a temperaturas distintas de entre -30 °C y -15 °C.

- 10.10.1. Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento que figuran en el manual del fabricante del termociclador, a menos que se indique lo contrario a continuación.
- 10.10.2. Deje que las mezclas maestras (para DIT y para DTC) se descongelen a temperatura ambiente. Deje que los tubos de control (controles positivos para DTC, controles positivos para DIT, controles de extracción y controles sin molde) se descongelen a temperatura ambiente. Después de usarlos, vuelva a meter los tubos de control en el congelador y anote el número de ciclos de congelación y descongelación. Mientras que los reactivos alcanzan la temperatura ambiente, anote en las placas de 96 pocillos para PCR por DIT o DTC, según proceda, un identificador único.

NOTA: Desarrolle las muestras en la misma placa para PCR que el control de extracción asociado.

- 10.10.3. Determine el número de pocillos (muestras, controles positivos para DTC, controles positivos para DIT, controles de extracción y control sin molde) que debe analizarse en las placas para DIT y DTC. El número de pocillos que debe analizarse por cada placa para DIT o DTC = X. Para evitar variaciones al pipetear volúmenes de reactivo pequeños, el valor mínimo de X es 2.

- 10.10.3.1. Calcule los volúmenes de mezcla maestra y Taq necesarios:

- Volumen total de mezcla maestra = $45 \mu\text{l} \times (X + 3)$
- Volumen total de Taq = $0,2 \mu\text{l} \times (X + 3)$
- Las tres muestras adicionales añadidas a X compensan los errores de pipeteo.

- 10.10.4. Introduzca los tubos de muestras maestras, controles y muestras de ADN en el agitador vorticial y agite a velocidad máxima durante 5-15 segundos.
- 10.10.5. Saque la Taq del lugar de conservación, que debe estar a entre -30°C y -15°C . No use el agitador vorticial.
- 10.10.6. Utilice la microcentrífuga para centrifugar todos los tubos (incluido el de Taq) entre 2 y 5 segundos y eliminar el líquido de las tapas.
- 10.10.7. Vierta los volúmenes correspondientes de la mezcla maestra y Taq en tubos del volumen que corresponda para las placas de DIT y DTC.
- 10.10.8. Tape y agite los tubos con el agitador vorticial a la velocidad máxima entre 5 y 15 segundos para mezclar su contenido. Utilice una microcentrífuga para centrifugar entre 2 y 5 segundos, cuando sea posible. Coloque la Taq en el lugar de conservación, que debe estar a entre -30°C y -15°C .
- 10.10.9. Pipetee 45 μl de la mezcla maestra y Taq en los pocillos correspondientes de la placa para PCR.
- 10.10.10. Añada 5 μl de las muestras de ADN a 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ y los controles a los pocillos correspondientes de la placa de 96 pocillos, de acuerdo con el esquema de la placa para PCR.
- 10.10.11. Selle las columnas de la placa para PCR con las tiras de pocillos. Centrifugue la placa de 96 pocillos a $1400 \times g$ durante 1 minuto.
- 10.10.12. Introduzca la placa para PCR en el termociclador y cierre la tapa. Programe el termociclador según se indica en la tabla 5.

Tabla 5: Programas del termociclador de amplificación mediante PCR

Paso	Programa CDx para DIT en <i>FLT3</i>	Programa CDx para DTC en <i>FLT3</i>
1	95 $^{\circ}\text{C}$ durante 11 minutos	94,5 $^{\circ}\text{C}$ durante 11 minutos
2	94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos	93,5 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos
3	57 $^{\circ}\text{C}$ durante 60 segundos	56,5 $^{\circ}\text{C}$ durante 60 segundos
4	72 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos	71,5 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos
5	Repita 24 veces los pasos 2-4	Repita 28 veces los pasos 2-4
6	94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos	93,5 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos
7	60 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos	59,5 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos
8	4 $^{\circ}\text{C}$ ∞	4 $^{\circ}\text{C}$ ∞

Velocidad de la rampa: 75 %.

- 10.10.13. Pulse **Run (Desarrollar)** para ver la siguiente pantalla. Asegúrese de que el ajuste del volumen de la reacción sea de 50 μl , de que el ajuste de la temperatura sea de 105,0 $^{\circ}\text{C}$ y de que la cubierta se caliente antes del desarrollo. Pulse **Start Run Now (Iniciar desarrollo)** para iniciar el desarrollo.
- 10.10.14. Guarde los reactivos y el ADN sobrantes. Conserve las mezclas maestras abiertas a entre -30°C y -15°C . Anote el número de ciclos de congelación y descongelación.
- 10.10.15. Tras finalizar el protocolo de PCR, puede almacenar la placa para PCR a entre 2 $^{\circ}\text{C}$ y 8 $^{\circ}\text{C}$ hasta 72 horas. Por lo que respecta a las placas para DTC, continúe con el apartado 10.11, *Digestión con la enzima de restricción (solo para mutados en el DTC)*; por lo que respecta a las placas para DIT, continúe con el apartado 10.12, *Detección mediante electroforesis capilar*.

10.11. Digestión con la enzima de restricción (solo para mutados en el DTC)

NOTA: Siga las instrucciones que figuran en este apartado el mismo día.

NOTA: Realice la digestión con la enzima de restricción solo en los amplicones del DTC.

NOTA: Reduzca al mínimo el tiempo de conservación de la EcoRV a temperaturas distintas de entre -30°C y -15°C .

- 10.11.1. Descongele a temperatura ambiente uno de los tubos de la solución amortiguadora NEBuffer r3.1.
- 10.11.2. Mientras que los reactivos alcanzan la temperatura ambiente, anote en una placa de 96 pocillos para la digestión del DTC un identificador único.
 - Determine el número de pocillos de la placa (muestras y controles) que debe digerirse. El número total de muestras que debe digerirse = Y. Para evitar variaciones al pipetear volúmenes de reactivo pequeños, el valor mínimo de Y es 4.

10.11.2.1. Calcule los volúmenes necesarios de NEBuffer r3.1 y EcoRV.

- Volumen total de NEBuffer r3.1 = $1,1 \mu\text{l} \times (Y + 6)$
- Volumen total de EcoRV = $0,5 \mu\text{l} \times (Y + 6)$
- Las seis muestras adicionales añadidas a Y compensan los errores de pipeteo.

- 10.11.3. Introduzca el tubo de la solución NEBuffer r3.1 en el agitador vorticial y agite a velocidad máxima durante 5-15 segundos.
- 10.11.4. Saque la enzima EcoRV del lugar de almacenamiento, que debe estar a entre -30°C y -15°C . No use el agitador vorticial.
- 10.11.5. Utilice la microcentrífuga para centrifugar todos los tubos (incluido el de EcoRV) entre 2 y 5 segundos y eliminar el líquido de las tapas
- 10.11.6. Añada los volúmenes calculados de NEBuffer r3.1 y EcoRV a un tubo del volumen que corresponda.
- 10.11.7. Pipetee arriba y abajo 10 veces para mezclar la solución. Vuelva a introducir la EcoRV en el lugar de conservación, que debe estar a entre -30°C y -15°C .
- 10.11.8. Pipetee $1,5 \mu\text{l}$ de la mezcla para digestión en los pocillos que corresponda de la placa para digestión.
- 10.11.9. Saque la placa para PCR por DTC del termociclador o del lugar de conservación a entre 2°C y 8°C (no es necesario que se alcance la temperatura ambiente) y centrifugue la placa a $1400 \times g$ durante 1 minuto.
- 10.11.10. Pipetee $8,5 \mu\text{l}$ de las muestras de la placa para PCR en los pocillos que corresponda de la placa para digestión. Selle las columnas de la placa para digestión con tiras protectoras.
- 10.11.11. Centrifugue la placa a $1400 \times g$ durante 1 minuto.
- 10.11.12. Introduzca la placa para digestión en el termociclador y cierre la tapa.
- 10.11.13. Programe el termociclador según se indica a continuación (velocidad de la rampa: 75 %).
 - Etapa 1: 37°C durante 1 hora
 - Etapa 2: 65°C durante 10 minutos
 - Etapa 3: 4°C durante ∞
- 10.11.14. Pulse **Run (Desarrollar)** para ver la siguiente pantalla. Asegúrese de que el ajuste del volumen de la reacción sea de $10 \mu\text{l}$, de que el ajuste de la temperatura sea de $105,0^\circ\text{C}$ y de que la cubierta se caliente antes del desarrollo. Pulse **Start Run Now (Iniciar desarrollo)** para iniciar el desarrollo.
- 10.11.15. Tras finalizar el protocolo de digestión, la placa para digestión puede guardarse al abrigo de la luz a entre 2°C y 8°C durante 72 horas como máximo. De lo contrario, continúe con el apartado 10.12, *Detección mediante electroforesis capilar*.

10.12. Detección mediante electroforesis capilar

NOTA: Reduzca al mínimo el tiempo de conservación del patrón de tamaño LIZ a temperaturas distintas de entre 2°C y 8°C .

NOTA: El 3500xL desarrolla conjuntos de 24 capilares en cada inyección, compuesta por tres columnas de ocho filas en una placa de 96 pocillos. Cada capilar se corresponde con un pocillo. No ofrece inyecciones parciales, aunque las inyecciones pueden programarse de manera independiente.

- 10.12.1. Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento que figuran en el manual del fabricante del 3500xL, a menos que se indique lo contrario a continuación.
- 10.12.2. Las pruebas de DIT y DTC deben desarrollarse mediante distintas inyecciones y con diferentes condiciones de inyección. La tabla 6 recoge las condiciones aplicables a las pruebas de DIT y DTC a través del 3500xL. Estos ajustes pueden guardarse en el 3500xL para un uso posterior.

Tabla 6: Condiciones aplicables al analizador genético 3500xL

Parámetro	Parámetros aplicables a la prueba CDx para DIT	Parámetros aplicables a la prueba CDx para DTC
Tiempo de inyección	12 s	7 s
Tensión de la inyección	1,2 kV	1,0 kV
Longitud del capilar	50 cm	
Polímero	POP-7	
Colorantes	G5	
Temperatura del horno	60°C	
Tiempo de desarrollo	1630 s	

Tabla 6: Condiciones aplicables al analizador genético 3500xL

Parámetro	Parámetros aplicables a la prueba CDx para DIT	Parámetros aplicables a la prueba CDx para DTC
Tensión del desarrollo	19,5 kV	
Tiempo previo al desarrollo	180 s	
Tensión previa al desarrollo	15 kV	
Retraso de datos	1 s	

- 10.12.3. Haga clic en **Refresh (Actualizar)** para actualizar el tiempo de los fungibles en el instrumento y el número de inyecciones realizadas en el 3500xL Dashboard (panel del 3500xL). Revise el panel del 3500xL para garantizar que las soluciones amortiguadoras, el polímero y los capilares no hayan superado el tiempo máximo permitido para la prueba, que se indican en la tabla 7. Asegúrese de que el número de muestras (no solo de inyecciones) restantes para POP-7 sea suficiente para el desarrollo. Si debe cambiar alguno de los fungibles, lleve a cabo las tareas de mantenimiento necesarias antes de proceder.

Tabla 7: Tiempo máximo admisible; material para el 3500xL

Material para el 3500xL	Tiempo máximo admisible en el instrumento
POP-7 Polymer (Polímero POP-7)	7 días
Anode Buffer (Amortiguador anódico)	7 días
Cathode Buffer (Amortiguador catódico)	7 días
3500xL Capillary Array (Matriz del capilar del 3500xL)	400 inyecciones

10.13. Preparación de la solución patrón, si es necesaria

- 10.13.1. La solución patrón es una mezcla de patrones de tamaño LIZ y formamida Hi-Di.
- 10.13.2. Saque un tubo de la solución patrón del lugar de conservación, que debe estar a entre 2 °C y 8 °C, y continúe en el apartado 10.13.6. Si no tiene, elabore la solución patrón siguiendo las instrucciones que figuran a continuación.
- 10.13.3. Descongele a temperatura ambiente un frasco de formamida Hi-Di. Saque un tubo del patrón de tamaño LIZ del lugar de conservación.
- 10.13.4. Introduzca los tubos en el agitador vorticial y agite velocidad máxima durante 5-15 segundos. Centrifugue los tubos durante 2-5 segundos en una microcentrífuga.
- 10.13.5. Pipetee 56 µl del patrón de tamaño LIZ en 1 ml de formamida Hi-Di. Anote en el tubo de la solución patrón la fecha de elaboración.
- 10.13.6. Introduzca el tubo de solución patrón en el agitador vorticial y agite velocidad máxima durante 5-15 segundos. Centrifugue el tubo de la mezcla durante 2-5 segundos en una microcentrífuga. Puede conservar los restos no utilizados a entre 2 °C y 8 °C hasta 7 días. Elimínelos transcurridos 7 días.

10.14. Preparación de la placa de muestras

- 10.14.1. Centrifugue la placa de 96 pocillos para PCR por DIT y de digestión para DTC a $1400 \times g$ durante 1 minuto.

NOTA: Las pruebas de DIT y DTC pueden desarrollarse en una misma placa de electroforesis capilar (EC), pero deben incluirse en diferentes inyecciones.

- 10.14.2. Anote un identificador único en la placa de 96 pocillos para EC por DIT y para EC por DTC que corresponda.
- 10.14.3. Determine el número de pocillos necesarios por desarrollo.
 - Número de pocillos = $24 \times X$
 - X = el número de inyecciones.
 - Calcule el volumen de solución patrón necesario.
 - Volumen máximo de la solución patrón = $9,5 \mu\text{l} \times (24 \times X + 4)$
 - Las cuatro muestras adicionales añadidas a X compensan los errores de pipeteo.

- 10.14.4. Añada 9,5 µl de la solución patrón a los pocillos de la placa para EC que contiene las muestras. Añada 9,5 µl de la solución patrón o de la formamida Hi-Di a los pocillos restantes sujetos a inyección (múltiplo de 24) que no contengan muestras.

NOTA: Los 24 pocillos de la inyección deben contener la mezcla de la solución patrón, la solución patrón sola o la formamida Hi-Di sola.

- 10.14.5. Transfiera 0,5 µl de los pocillos con el producto de la PCR (DIT) o de la digestión (DTC) a los pocillos que corresponda de la placa para EC con una pipeta multicanal.

NOTA: Puede usarse una pipeta monocanal para transferir el producto de la PCR/digestión durante la repetición de los análisis de los pocillos individuales.

- 10.14.6. Selle la placa para EC con una lámina de aluminio y centrifugue a $1400 \times g$ durante 1 minuto.

- 10.14.7. Introduzca la placa para EC en un termociclador y cierre la tapa.

- 10.14.8. Programe el termociclador según se indica a continuación (velocidad de la rampa: 75 %).

- Etapa 1: 95 °C durante 3 minutos
- Etapa 2: 4 °C durante 5 minutos

- 10.14.9. Pulse **Run (Desarrollar)** para ver la siguiente pantalla. Asegúrese de que el ajuste del volumen de la reacción sea de 10 µl, de que el ajuste de la temperatura sea de 105,0 °C y de que la cubierta se caliente antes del desarrollo. Pulse **Start Run Now (Iniciar desarrollo)** para iniciar el desarrollo.

- 10.14.10. Una vez finalizado el desarrollo, asegúrese de que no haya burbujas revisando visualmente los pocillos de las placas. Retire las burbujas existentes centrifugando la placa para EC a $1400 \times g$ durante 1 minuto.

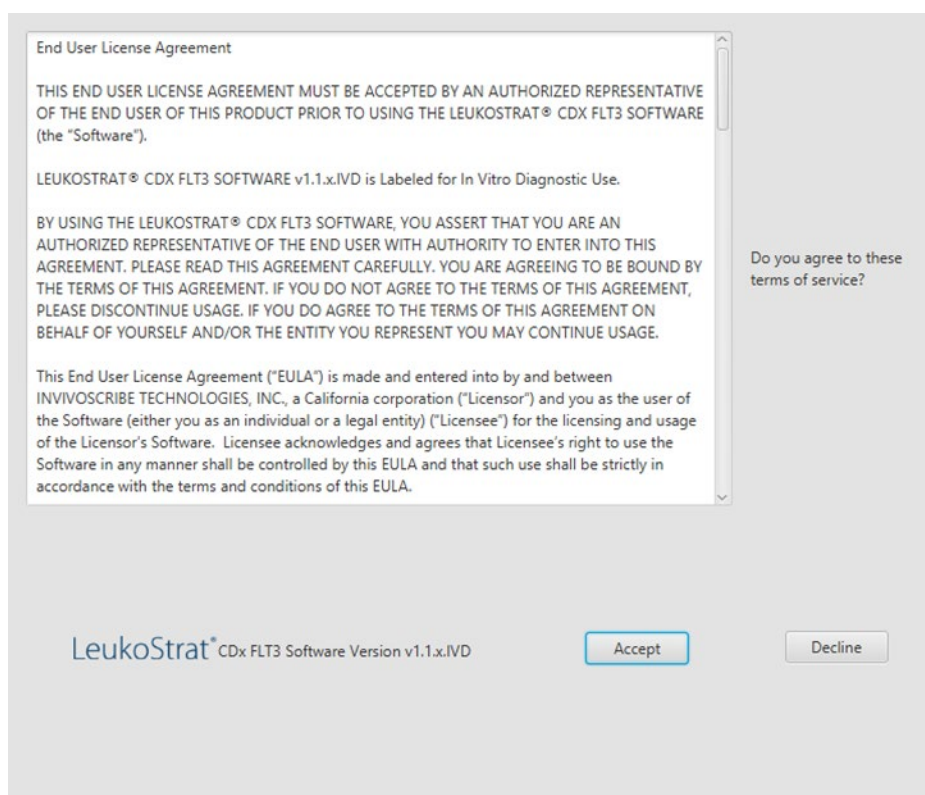
- 10.14.11. Coloque la placa para EC sobre la base de 96 pocillos del equipo 3500xL y asegúrese de que coincidan las esquinas con muescas. Retire la lámina de aluminio y coloque una membrana de goma para placas de 96 pocillos sobre la placa; asegúrese de que la membrana quede plana y de que las aberturas no estén obstruidas. Coloque un retenedor para las placas de 96 pocillos del equipo 3500xL.

10.15. Configuración de PlateMapper con el software (software) LeukoStrat CDx FLT3

10.15.1. Instale el software (software) LeukoStrat CDx FLT3.

- 10.15.1.1. Copie el archivo *LeukoStratCDx v1.1.x.IVD_setup.exe* del CD del software en la unidad local de su equipo.
- 10.15.1.2. Haga doble clic en el archivo **LeukoStratCDx v1.1.x.IVD_setup.exe**. Podría aparecer el cuadro de diálogo *User Account Control (Control de la cuenta del usuario)*. Haga clic en **Yes (Sí)** para continuar con la instalación.
- 10.15.1.3. Aparecerá el cuadro de diálogo del instalador *LeukoStratCDx v1.1.x.IVD* Excelsior. Haga clic en **Next (Siguiente)**.
- 10.15.1.4. Instale la aplicación para *Anyone who uses this computer (Cualquiera que utilice este ordenador)*. Haga clic en **Next (Siguiente)**.
- 10.15.1.5. Elija una ubicación para la instalación de la *Destination folder (Carpeta de destino)*. Haga clic en **Next (Siguiente)**.
- 10.15.1.6. En el cuadro de diálogo *Program Folder (Carpeta del programa)*, aparecerá “Invivoscribe, Inc\LeukoStratCDx v1.1.x.IVD” si se seleccionó la ubicación por defecto. Haga clic en **Next (Siguiente)** y en **Next (Siguiente)** en la ventana siguiente también. Debe comenzar la instalación. Cuando finalice la instalación, cierre la ventana.

10.15.2. Abra el software (software) *LeukoStrat CDx FLT3*. Haga clic en **Accept (Aceptar)** () para aceptar los términos del servicio.



- 10.15.3. En *PlateMapper Setup (Configuración de PlateMapper)*, rellene los tres campos obligatorios, que encontrará sobre el mapa de la placa. Los campos obligatorios son *Plate Name (Nombre de la placa)*, *Results Group (Grupo de resultados)* y *File Name Convention (Convención del nombre del archivo)* (se han rodeado con un círculo).
- 10.15.3.1. Los nombres del mapa de la placa solo pueden contener 50 caracteres y deben estar formados por [A-Z, a-z, 0-9], espacios únicos y guiones.
- 10.15.3.2. Los datos que introduzca en *Results Group (Grupo de resultados)* y *File Name Convention (Convención del nombre del archivo)* deben coincidir con los que el usuario haya introducido en el 3500xL (consulte el apartado 10.16.13).

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

PlateMapper Setup CDx Analysis

LeukoStrat® CDx PlateMapper

Import ABI Import LIVS

Plate Name* Results Group* File Name Convention* PlateBarcode

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Assay 1 Assay 2 Assay 3 Assay 4

Clear Plate Save Plate

* Indicates required field

- 10.15.4. El mapa de la placa admite cuatro pruebas por placa (tres columnas por prueba). Cada prueba se corresponde con la inyección aplicable durante el desarrollo con el 3500xL. Solo se puede desarrollar una prueba por inyección (DIT o DTC).

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

PlateMapper Setup CDx Analysis

LeukoStrat® CDx PlateMapper

Import ABI Import LIVS

Plate Name* Results Group* File Name Convention* PlateBarcode

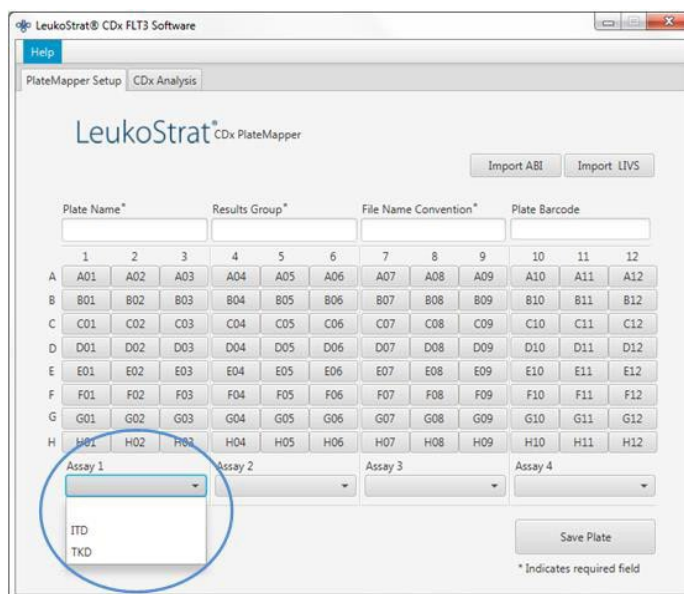
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Assay 1 Assay 2 Assay 3 Assay 4

Clear Plate Save Plate

* Indicates required field

- 10.15.5. Seleccione la prueba en cuestión en el menú desplegable (), que se corresponde con las muestras que encontrará justo encima, en la pantalla *PlateMapper Setup* (*Configuración de PlateMapper*).



LeukoStrat® CDx FLT3 Software

PlateMapper Setup | CDx Analysis

LeukoStrat® CDx PlateMapper

Import ABI | Import LIVS

Plate Name* | Results Group* | File Name Convention* | Plate Barcode

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Assay 1 | Assay 2 | Assay 3 | Assay 4

ITD
TKD

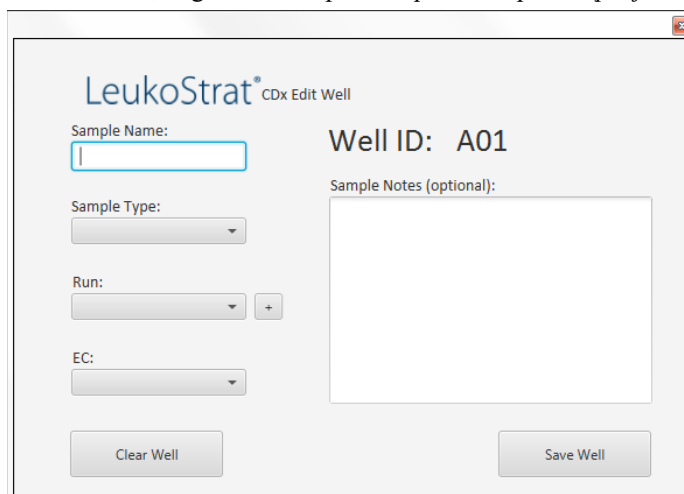
Save Plate

* Indicates required field

- 10.15.6. Introduzca, en el mapa de la placa, los datos de cada pocillo que contendrá una muestra o un control para analizar.

NOTA: Los datos que deben introducirse en cada pocillo son el Extraction Control (EC) (Control de extracción [CE]), el Positive Control (PC) (Control positivo [CP]) y el No Template Control (NTC) (Control sin molde [CSM]). Los controles pueden ubicarse en cualquier punto de la placa y no necesariamente en los tres primeros pocillos. Después, introduzca los datos de los pocillos que contengan la MUESTRA, pues deben vincularse a un control de extracción. Los controles positivos y los controles sin molde no están vinculados a ningún control de extracción.

- 10.15.6.1. Para introducir datos, haga clic en el pocillo que corresponda (*p. ej.*, A01) y se abrirá el siguiente cuadro:



LeukoStrat® CDx Edit Well

Sample Name:

Well ID: A01

Sample Type:

Run: +

EC:

Sample Notes (optional):

Clear Well | Save Well

- 10.15.7. Introduzca un *Sample Name* (Nombre de la muestra) que describa el pocillo. Los nombres de la muestra solo pueden contener 50 caracteres y deben estar formados por [A-Z, a-z, 0-9], espacios únicos y guiones.
- 10.15.7.1. El usuario también puede importar los nombres de las muestras al mapa de la placa a través del *3500 Plate Layout File Version 1.0 (Archivo de diseño de la placa 3500, versión 1.0)* de Thermo Fisher Scientific. Introduzca los nombres de las muestras en el *3500 Plate Layout File (Archivo de diseño de la placa 3500)* e impórtelos con el botón **Import ABI (Importar ABI)**.

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

PlateMapper Setup | CDx Analysis

LeukoStrat® CDx PlateMapper

Import ABI | Import LIVS

Plate Name* Results Group* File Name Convention* PlateBarcode

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Assay 1 Assay 2 Assay 3 Assay 4

Clear Plate Save Plate

* Indicates required field

- 10.15.8. Seleccione el **Sample Type (Tipo de muestra)** de cada pocillo en el menú desplegable. Las opciones que puede seleccionar son:
- SAMPLE (MUESTRA) = Unknown (Desconocida)
 - EC (CE) = Extraction Control (Control de extracción)
 - NTC (CSM) = No Template Control (Control sin molde)
 - PC (CP) = Positive Control (Control positivo)

LeukoStrat® CDx Edit Well

Sample Name:

Well ID: A01

Sample Type:

SAMPLE

EC

NTC

PC

EC:

Sample Notes (optional):

Clear Well Save Well

- 10.15.9. Seleccione el **Run Number (Número de desarrollo)** en el menú desplegable. Para añadir un nuevo número de desarrollo, haga clic en +, que encontrará junto al menú desplegable.

NOTA: El “desarrollo” lo define el conjunto de las muestras, la réplica del control positivo, los controles de extracción asociados con las muestras analizadas y la réplica del control sin molde. El desarrollo puede abarcar varias inyecciones. Además, pueden realizarse varios desarrollos en una misma placa.

LeukoStrat[®] CDx Edit Well

Sample Name: Test1

Well ID: A01

Sample Type: SAMPLE

Run: 1

Sample Notes (optional):

Clear Well Save Well

- 10.15.9.1. Seleccione el CE asociado en el menú desplegable (solo es necesario si el *Sample Type* (Tipo de muestra) es *SAMPLE [MUESTRA]*). Pueden asociarse hasta 11 muestras a un solo control de extracción.

LeukoStrat[®] CDx Edit Well

Sample Name: s01

Well ID: A01

Sample Type: SAMPLE

Run: 1

EC: B01

Sample Notes (optional):

Clear Well Save Well

- 10.15.10. En el campo *Sample Notes (Notas de la muestra)*, pueden introducirse comentarios adicionales sobre la muestra o el control. Estos comentarios aparecerán en el *Sample Report (Informe de la muestra)*.
- 10.15.11. Una vez que se hayan introducido los datos sobre el pocillo, haga clic en **Save Well (Guardar pocillo)** para guardar. Para borrar el contenido del pocillo, haga clic en **Clear Well (Borrar pocillo)**.

- 10.15.12. Una vez guardado, cambiará el color en el que se muestra el pocillo. El pocillo se pondrá de color rojo hasta que se haya configurado correctamente, momento en el que se pondrá de color verde (como se ve a continuación).

NOTA: Si es correcto, el color del pocillo del control de extracción no se pondrá de color verde hasta que se desplace el cursor por encima.

- 10.15.13. Para continuar, introduzca los datos de cada pocillo en la pantalla *PlateMapper Setup (Configuración de PlateMapper)* hasta que todos los pocillos estén resaltados en verde.
- 10.15.14. Cuando haya introducido los datos de todos los pocillos, haga clic en **Save Plate (Guardar placa)** y se le preguntará dónde quiere guardar el archivo ABI (3500 Plate Layout File Version 1.0) y el archivo LIVS que genera el software. Se generará un archivo ABI y un archivo LIVS por configuración.

NOTA: No modifique el archivo ABI que genera el software (software) LeukoStrat CDx FLT3. Si lo hace, se producirá un error al cargarlo en el equipo 3500xL.

NOTA: Si no cierra el software (software) LeukoStrat CDx FLT3 cuando se genere el mapa de la placa, los identificadores de desarrollo asignados automáticamente a los archivos de salida no serán únicos y se repetirán en distintos desarrollos.

10.15.14.1. Para revisar el archivo LIVS, el usuario debe hacer clic en **Import LIVS (Importar LIVS)** y acceder a la ubicación donde se guardó.

NOTA: La función **Import LIVS (Importar LIVS)** solo resulta útil para la revisión de la configuración de la placa. El archivo LIVS no puede modificarse para crear un mapa nuevo para un nuevo desarrollo. Hacerlo daría lugar a error.

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

Help | PlateMapper Setup | CDx Analysis

LeukoStrat® CDx PlateMapper

Import ABI | **Import LIVS**

Plate Name* | Results Group* | File Name Convention* | PlateBarcode

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Assay 1 | Assay 2 | Assay 3 | Assay 4

Clear Plate | Save Plate

* Indicates required field

10.15.15. El software seguirá activo tras el fin del desarrollo en el equipo 3500xL.

10.15.16. Utilice el archivo ABI que genere el software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* para cargar la placa en el 3500xL.

10.15.17. Si se produce algún error al guardar la placa, siga las recomendaciones de la tabla 8. Si necesita asistencia adicional, póngase en contacto con el servicio técnico de Invivoscribe a través de support@invivoscribe.com.

Tabla 8: Mensajes de error al guardar la placa y acciones correctivas

Mensaje de error al guardar la placa [código]	Posibles causas	Acciones correctivas
- Corrupted sample detected (Se ha detectado que la muestra está dañada). [PM01] - Could not detect well for object UUID (No se ha detectado el pocillo para el UUID del objeto). [PM02] - Control detected unknown links for well (El dispositivo de control ha detectado vínculos en el pocillo [A-H, 01-12]). [PM03]	Se intentó cargar un archivo LIVS modificado.	No modifique el archivo LIVS. Si el archivo está dañado, debe crearse un nuevo archivo LIVS.
- Missing required field "Plate Name" (No se ha rellenado el campo obligatorio Nombre de la placa). [PM04] - Illegal character detected in "Plate Name" (Se ha detectado un carácter no permitido en Nombre de la placa). [PM05] - Multiple spaces detected in "Plate Name" (Se han detectado varios espacios en Nombre de la placa). [PM06] - Plate Name must be 50 characters or less (El Nombre de la placa debe tener 50 caracteres como máximo). [PM28]	No se han seguido las instrucciones de designación la placa.	El nombre del mapa puede contener hasta 50 caracteres y debe estar compuesto por [A-Z, a-z, 0-9], espacios únicos y guiones.
Missing required field "Result Group" (No se ha rellenado el campo obligatorio Grupo de resultados). [PM07]	No se han seguido las instrucciones de designación de <i>Result Group</i> (Grupo de resultados).	El <i>Result Group</i> (Grupo de resultados) se define en el equipo 3500xL.
Missing required field "File Naming Convention" (No se ha rellenado el campo obligatorio Convención del nombre del archivo). [PM08]	No se han seguido las instrucciones de designación de la <i>File Naming Convention</i> (Convención del nombre del archivo).	La <i>File Naming Convention</i> (Convención del nombre del archivo) se define en el equipo 3500xL.
- Assay not selected for all samples (No se ha seleccionado la prueba aplicable a las muestras). [PM09] - Run contains more than 1 Assay type (El desarrollo contiene más de 1 tipo de prueba). [PM10]	No se han seguido las instrucciones de asignación del tipo de prueba.	Se debe asignar un tipo de prueba a cada pocillo y no puede haber más de un tipo de prueba en cada desarrollo.
- Sample name not detected for well (A-H, 01-12) (No se ha detectado el Nombre de la muestra del pocillo [A-H, 01-12]). [PM11] - Illegal character detected in Sample Name (Se ha detectado un carácter no permitido en Nombre de la muestra). [PM12] - Multiple spaces detected in Sample Name (Se han detectado varios espacios en Nombre de la muestra). [PM13] - Sample name must be 50 characters or less (El Nombre de la muestra debe tener 50 caracteres como máximo). [PM14]	No se han seguido las instrucciones de designación de la muestra.	El nombre de la muestra puede contener hasta 50 caracteres y debe estar compuesto por [A-Z, a-z, 0-9], espacios únicos y guiones.

Tabla 8: Mensajes de error al guardar la placa y acciones correctivas

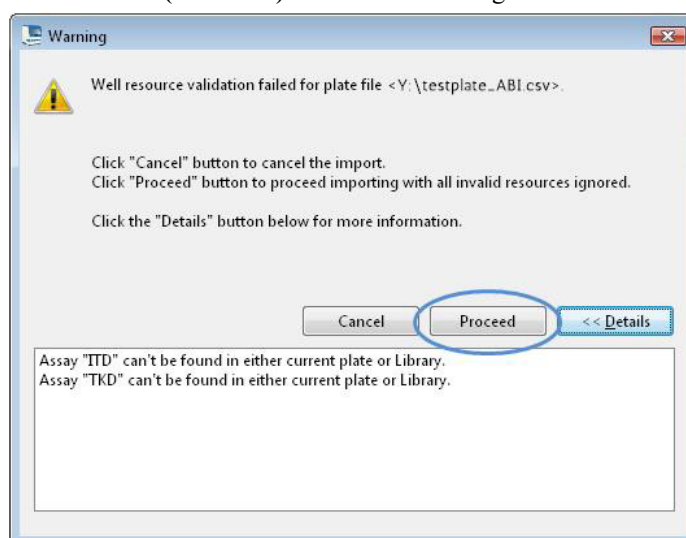
Mensaje de error al guardar la placa [código]	Posibles causas	Acciones correctivas
Sample Type not selected for well (A-H, 01-12) (No se ha seleccionado el Tipo de muestra para el pocillo [A-H, 01-12]). [PM15]	No se han seguido las instrucciones de selección del tipo de muestra.	Debe asignarse un tipo de muestra a cada pocillo. Las opciones son <i>CP</i> , <i>CSM</i> , <i>CE</i> y <i>MUESTRA</i> .
- Run not selected for well (A-H, 01-12) (No se ha seleccionado el desarrollo del pocillo [A-H, 01-12]). [PM16] - No Runs created for Plate (No se han creado el desarrollo de la placa). [PM17]	No se han seguido las instrucciones de selección desarrollos.	Debe asignarse un desarrollo a cada pocillo. Tras asignar el primer pocillo a un desarrollo, el usuario tendrá que incrementar la cifra de desarrollos (botón "+" situado junto a <i>Run</i> (Desarrollo). A continuación, puede incrementarse el número de desarrollos o seleccionarse un número de desarrollos anterior.
- EC not selected for well (A-H, 01-12) (No se ha seleccionado el CE para el pocillo [A-H, 01-12]). [PM18] - Sample attached to unknown EC for well (A-H, 01-12) (Muestra vinculada a un CE desconocido para el pocillo [A-H, 01-12]). [PM19] - EC selected on control for well (A-H, 01-12) (Se ha seleccionado un CE para el pocillo [A-H, 01-12]). [PM20] - No samples linked to EC for well (A-H, 01-12) (No se han vinculado muestras con el CE del pocillo [A-H, 01-12]). [PM21]	- No se han seguido las instrucciones de asignación de los CE. - Se ha intentado cargar un archivo LIVS modificado.	A todos los pocillos del tipo <i>SAMPLE</i> (MUESTRA) se les debe asignar un CE. No asigne CE a los pocillos de control. Cada CE debe vincularse al menos con una muestra.
- Run missing PC, NTC, EC (En el desarrollo faltan el CP, el CSM y el CE). [PM22] - Run detected control in sample list (El desarrollo ha detectado un control en la lista de muestras). [PM23] - Run missing samples (Faltan muestras en el desarrollo). [PM24] - Run contains more than 1 Assay type (El desarrollo contiene más de 1 tipo de prueba). [PM25]	- No se han seguido las instrucciones de asignación de los desarrollos. - Se ha intentado cargar un archivo LIVS modificado.	En cada desarrollo, debe haber un control de cada tipo (CP, CSM, CE). En cada desarrollo, debe haber al menos un pocillo del tipo <i>SAMPLE</i> (MUESTRA). Cada desarrollo debe contener exactamente un tipo de prueba.
- Too many samples linked to EC for well (A-H, 01-12) (Se han vinculado demasiadas muestras al CE del pocillo [A-H, 01-12]). [PM26] - EC linked to more than one run for well (A-H, 01-12) (Se ha vinculado un CE a más de un desarrollo para el pocillo [A-H, 01-12]). [PM27]	No se han seguido las instrucciones de asignación de los CE.	Los CE no pueden vincularse a más de 11 muestras. Los CE no pueden vincularse a muestras de distintos desarrollos.

10.16. Configuración del software del equipo 3500xL

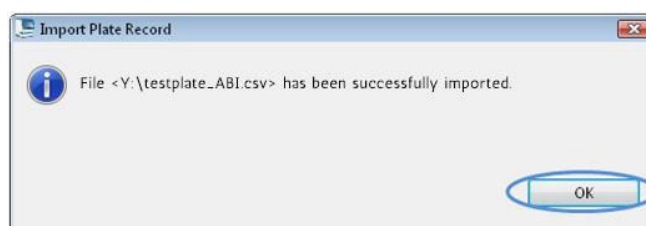
NOTA: El software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* genera un archivo que debe importarse al equipo 3500xL (archivo ABI); este incorpora datos al nombre de la muestra. El software del 3500xL puede incorporar información adicional.

- 10.16.1. Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento que figuran en el manual del fabricante del 3500xL, a menos que se indique lo contrario a continuación.
- 10.16.2. Haga clic en el botón **Create New Plate (Crear placa nueva)** del panel del 3500xL.
- 10.16.3. Introduzca un descriptor breve del *Plate Name (Nombre de la placa)*.
- 10.16.4. Asegúrese de que el número de pocillos se fije en 96.

- 10.16.5. Seleccione **Fragment (Fragmento)** en el menú desplegable para indicar el tipo de placa.
- 10.16.6. Asegúrese de que la longitud del capilar sea de *50 cm* y de que el polímero sea *POP7*.
- 10.16.7. Introduzca las iniciales del operario en la sección *Owner (Propietario)*.
- 10.16.8. Haga clic en **Assign Plate Contents (Asignar el contenido de la placa)**.
- 10.16.9. Haga clic en el botón **Import (Importar)**, situado en la parte superior de la pantalla, y aparecerá una ventana emergente. Acceda al archivo de importación del 3500xL (archivo ABI) que haya generado el software (software) LeukoStrat CDx *FLT3*. Haga clic en **OPEN (ABRIR)** en la ventana desplegable. A continuación, haga clic en **OK (Aceptar)** en la ventana emergente de confirmación de la importación.
 - 10.16.9.1. Si no se detectan coincidencias en la biblioteca del 3500xL para el nombre de la prueba (en el archivo ABI), haga clic en **Proceed (Proceder)** en la ventana emergente:



- 10.16.10. Haga clic en **OK (Aceptar)** en la siguiente ventana emergente.



- 10.16.11. Una vez completada la importación, en la placa aparecerán los identificadores de las muestras. Asegúrese de que el esquema sea correcto revisando los identificadores de las muestras. Si las muestras no coinciden con la configuración prevista, tendrá que crear un nuevo archivo ABI en el software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* y volver a importarlo al ABI 3500xL.
- 10.16.12. Confirme las pruebas programadas en el 3500xL a través de los parámetros que figuran en la tabla 6 para la ITD CDx Assay (prueba CDx por DIT) o TKD CDx Assay (prueba CDx en DTC).
- 10.16.13. Asigne *Assay (Prueba)*, *Results Group (Grupo de resultados)* y *File Name Convention* (Convención del nombre del archivo) a todos los pocillos que contengan muestras y controles, si es necesario.

NOTA: El primer atributo de la *File Name Convention* (Convención del nombre del archivo) debe ser el *Sample Name* (Nombre de la muestra).

- 10.16.14. Cargue las placas en el 3500xL.
- 10.16.15. Haga clic en **Link Plate for Run (Vincular placa para desarrollo)**. El operario podrá guardar los cambios en la placa. Si debe desarrollar una segunda placa, repita los pasos comprendidos entre el 10.16.2 y el 10.16.14.

10.17. Desarrollo en el analizador genético 3500xL

- 10.17.1. Asegúrese de que no haya burbujas en el tubo de POP-7. Elimine las burbujas si es necesario.
- 10.17.2. Haga clic en **Start Run (Iniciar desarrollo)** para iniciar el desarrollo en el 3500xL.
- 10.17.3. Una vez completado el desarrollo, extraiga y elimine la membrana y elimine la placa para EC.

10.18. Análisis de datos con el software GeneMapper

NOTA: No reemplace los errores de las soluciones patrón en los pocillos con el software GeneMapper.

- 10.18.1. Abra el software *GeneMapper v4.1.x*.
- 10.18.2. En el *File Menu (menú Archivo)*, seleccione **New Project (Nuevo proyecto)** y **Microsatellite (Microsatélite)**. Haga clic en **OK (Aceptar)**. Vuelva al *File Menu (menú Archivo)* y seleccione **Add Samples to Project (Agregar muestras al proyecto)**.
- 10.18.3. Desde el panel izquierdo, acceda a los archivos de datos de la carpeta de datos del 3500xL (el nombre concuerda con el de Results Group [Grupo de resultados]) y haga clic en **Add to List (Añadir a la lista)** para transferirlos al panel derecho. Haga clic en el botón **Add (Añadir)** o **Add & Analyze (Añadir y analizar)**.
- 10.18.4. Asegúrese de que el *Analysis Method (Método de análisis)* se haya ajustado al método *Microsatellite (Microsatélite)* y de que el *Size Standard (Patrón de tamaño)* se haya ajustado a *GS600LIZ+Normalization (GS600LIZ+Normalización)* para todas las muestras.

NOTA: Si existen distintos tipos de análisis en una placa, las opciones *Analysis Method (Método de análisis)* y *Size Standard (Patrón de tamaño)* deben ajustarse por inyección para facilitar el flujo de trabajo. Las *Injections (Inyecciones)* pueden seleccionarse desde la ventana *Project (Proyecto)*.

- 10.18.5. Configure el Analysis Method (Método de análisis) según se indica en la Figura 3.
 - 10.18.5.1. Haga clic en **Analysis (Análisis)** y, a continuación, en **Analysis Method Editor (Editor del método de análisis)** en el menú de la parte superior de la pantalla.
 - 10.18.5.2. En la pestaña *Peak Detector (Detector de picos)*, asegúrese de que el *Peak Detection Algorithm (Algoritmo de detección de picos)* se fije en **Advanced (Avanzado)**.
 - 10.18.5.3. Asegúrese de que los *Peak Amplitude Thresholds (Umbral de amplitud del pico)* se hayan fijado en 100 para los colorantes B (azul) y G (verde) y en 50 para los demás colorantes: Y (amarillo), R (rojo), P (morado) y O (naranja). Los colorantes amarillo y morado no se utilizan en la LeukoStrat CDx FLT3 Mutation Assay.
 - 10.18.5.4. Asegúrese de que el *Polynomial Degree (Grado polinómico)* se fije en 3 para DIT y en 5 para DTC.
 - 10.18.5.5. Haga clic en **OK (Aceptar)** en la parte inferior de la ventana.

NOTA: En GeneMapper, pueden configurarse y usarse métodos de análisis específicos para DIT y DTC. Para ello, acceda a *Tools (Herramientas)* y seleccione **GeneMapper Manager (Administrador de GeneMapper)**. En la pestaña *Analysis Methods (Métodos de análisis)*, haga clic en el botón **New... (Nuevo...)** y seleccione el tipo de análisis **Microsatellite (Microsatélite)**. Haga clic en **OK (Aceptar)**. Introduzca el *Name (Nombre)*, la *Description (Descripción)* y el *Instrument (Instrumento)* en la pestaña *General (General)*. Configure la pestaña *Peak Detector (Detector de picos)* según se indica más arriba y en la figura 3; en las pestañas *Allele (Alelo)*, *Peak Quality (Calidad del pico)* y *Quality Flags (Marcas de calidad)*, mantenga los valores predefinidos para el *Microsatellite (Microsatélite)*. Seleccione **Done (Listo)** y seleccione un nuevo método de análisis.

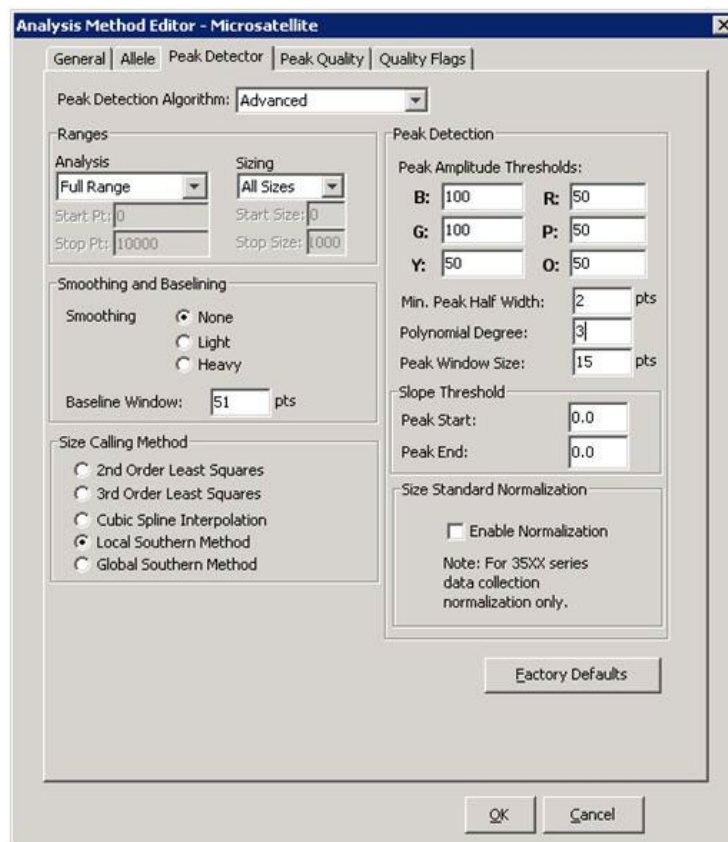
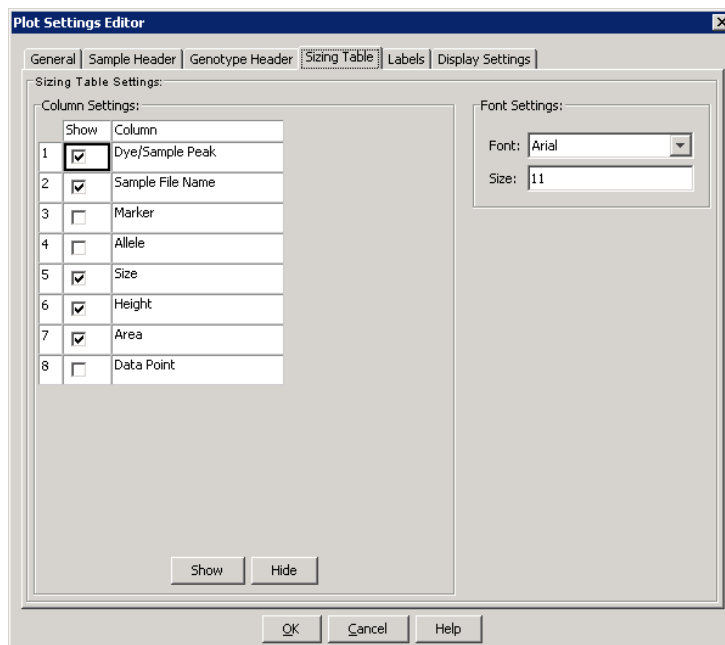


Figura 3: Configuración del protocolo Sizecalling para DIT. La configuración para DTC es idéntica, con la excepción de que el *Polynomial Degree* (*Grado polinómico*) se fija en 5.

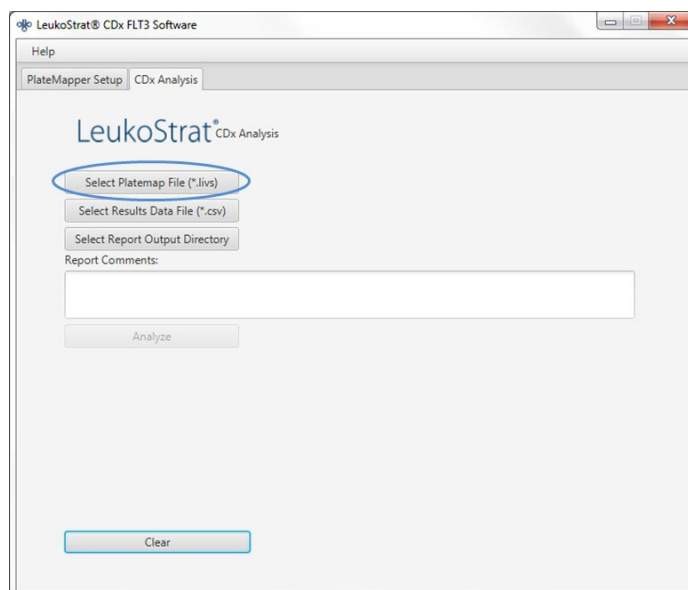
- 10.18.6. Haga clic en el botón verde **Play (Reproducir)** para iniciar el análisis. Se le pedirá que guarde el archivo. Guarde el proyecto de GeneMapper con el nombre que corresponda. El nombre de la ruta del archivo debe tener como máximo 256 caracteres.
- 10.18.7. En el software GeneMapper, marque las muestras y los controles que deban analizarse y haga clic **Display Plots (Mostrar gráficos)**. Asegúrese de haber seleccionado el icono *Sizing Table* (*Tabla de tamaños*) y los colorantes azul, verde y rojo en la ventana *Samples Plot* (*Gráfico de las muestras*).
- 10.18.8. Asegúrese de que la tabla de debajo del electroferograma contenga las siguientes columnas: *Dye/Sample Peak* (*Pico de la muestra/colorante*), *Sample File Name* (*Nombre del archivo de la muestra*), *Size* (*Tamaño*), *Height* (*Altura*) y *Area* (*Área*). De lo contrario, seleccione **Tools (Herramientas)** y, a continuación, **Plot Settings... (Ajustes del gráfico...)** del menú *Samples Plot* (*Gráfico de las muestras*). Seleccione la pestaña *Sizing Table* (*Tabla de tamaños*) y asegúrese de que haya una marca de verificación verde junto a los siguientes elementos en la columna *Show* (*Mostrar*): *Dye/Sample Peak* (*Pico de la muestra/colorante*), *Sample File Name* (*Nombre del archivo de la muestra*), *Size* (*Tamaño*), *Height* (*Altura*) y *Area* (*Área*). Haga clic en **OK (Aceptar)**.



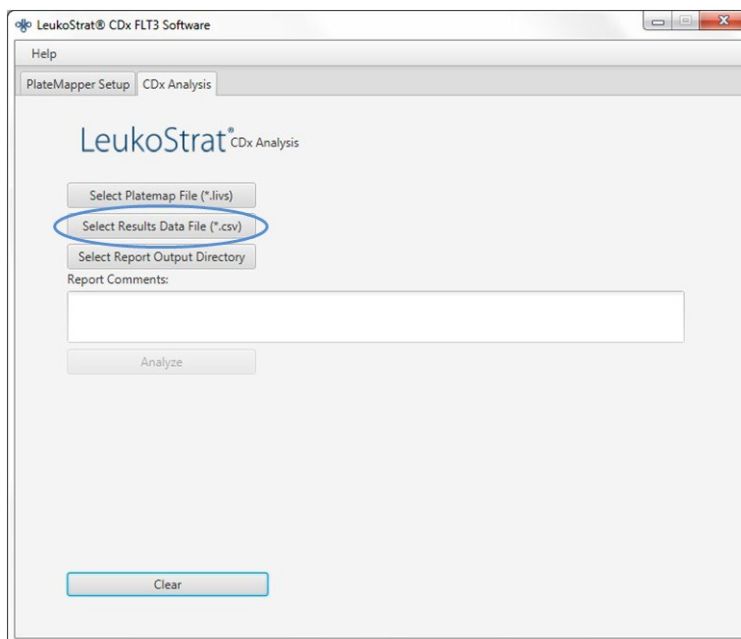
- 10.18.9. Para exportar los datos de la tabla de tamaños, seleccione **File (Archivo)** y, a continuación, **Export Table (Exportar tabla)** en el menú *Samples Plot (Gráfico de las muestras)*. Introduzca un nombre de archivo y seleccione la ubicación para guardar el archivo. En el menú desplegable *Export File As (Exportar archivo como)*, seleccione **Comma-separated values (archivo .csv)**. Además, en el menú *Files of type (Archivos de tipo)*, seleccione **Comma-separated values (archivo .csv)**. Haga clic en **Export (Exportar)**.

10.19. Análisis de datos con el software (software) LeukoStrat CDx FLT3.

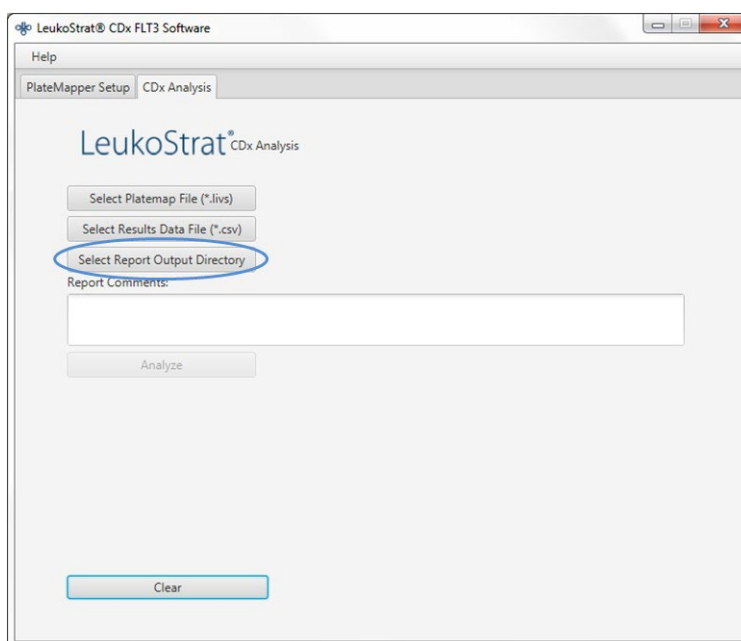
- 10.19.1. Abra el software (software) LeukoStrat CDx FLT3, acepte el contrato de licencia y haga clic en la pestaña *CDx Analysis (Análisis CDx)* del software (software) LeukoStrat CDx FLT3. Haga clic en **Select Platemap File (Seleccionar archivo del mapa de placa) (*.lvs)** y acceda al archivo LIVS que se haya generado en la pestaña *PlateMapper Setup (Configuración de PlateMapper)*.



- 10.19.2. Haga clic en **Select Results Data File (Seleccionar el archivo de datos de resultados) (*.csv)** y seleccione uno de los archivos .csv exportados como se indica en el apartado 10.18.9 para su análisis.



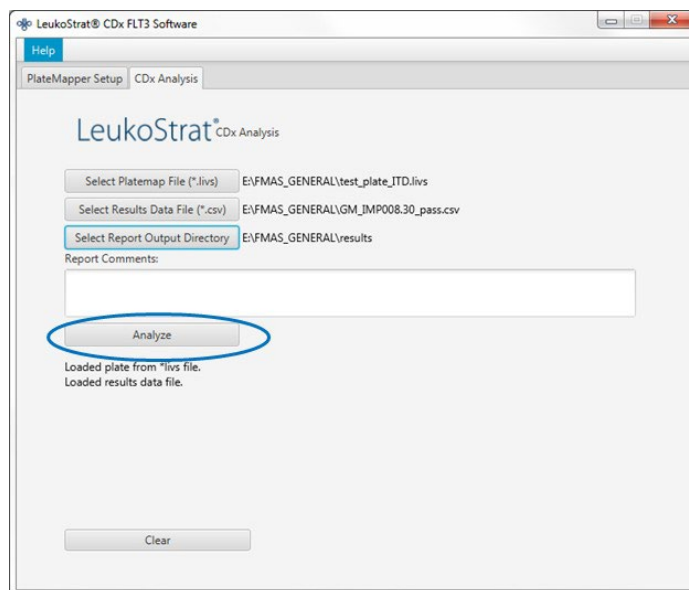
- 10.19.3. Haga clic en **Select Results Output Directory (Seleccionar el directorio de salida de resultados)** y elija la carpeta de destino de los resultados.



- 10.19.3.1. En el campo *Report Comments (Comentarios del informe)*, pueden introducirse comentarios adicionales sobre el desarrollo, las muestras o los controles. Estos comentarios aparecerán en el *Run Report (Informe del desarrollo)*.

NOTA: Una vez seleccionados los archivos, no cree ni importe un nuevo *Plate Map (Mapa de la placa)* en la pestaña *PlateMapper Setup (Configuración de PlateMapper)* antes de analizar el desarrollo o los datos actuales. Si modifica de algún modo los datos de la pestaña *PlateMapper Setup (Configuración de PlateMapper)* antes de seleccionar el botón **Analyze (Analizar)**, en el informe aparecerá un *Plate Name (Nombre de placa)* incorrecto.

- 10.19.4. Una vez seleccionados los tres archivos, podrá seleccionar el botón **Analyze (Analizar)**. Haga clic en **Analyze (Analizar)** y se generarán tres tipos de informes en la carpeta de destino: un *PDF Run Report (Informe del desarrollo en PDF)*, un *PDF Sample Report(s) (Informe de la muestra en PDF)* y un *CSV run export file (Archivo de exportación del desarrollo en CSV)* (consulte la Figura 4, Figura 5, y la Figura 6).
- El *Run Report (Informe del desarrollo)* contendrá un resumen de los resultados de los controles y las muestras. El *Sample Report (Informe de la muestra)* contendrá los resultados de los controles y de la muestra. El *CSV run export file (Archivo de exportación del desarrollo en CSV)* contendrá los resultados del desarrollo como hoja de cálculo. Los identificadores de los informes del software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* se corresponden con los últimos 12 caracteres de los identificadores que genere el software.



LeukoStrat® CDx FLT3 Software

Run Report:

Run Information			
Run ID	fb170062-996c-4859-90c7-000000000001		
Plate ID	9dd67e4f-d8d0-4016-b72c-f7179eaae829	Assay	ITD
Plate Barcode	01234	Analysis Date	2022-12-02 10:49:49 AM
Plate Name	UnitTestPlate	Run Pass/Fail	Pass

Controls				
Type	Name	ID	Pass/Fail	Fail Detail
PC	PControl1_ITD_PC_H01	08277bd1d8e5	Pass	
NTC	NTCControl1_ITD_NTC_F01	4a6bf004cd22	Pass	
EC	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	4e614e4d9b70	Pass	

Samples				
Sample Name	EC ID	Pos/Neg/Fail	Signal Ratio	Fail Detail
SampleA01_ITD_SAMPLE_A01	4e614e4d9b70	Positive	0.09	
SampleA02_ITD_SAMPLE_A02	4e614e4d9b70	Positive	0.07	
SampleA03_ITD_SAMPLE_A03	4e614e4d9b70	Positive	0.11	
SampleA04_ITD_SAMPLE_A04*	4e614e4d9b70	Negative	0.00	
SampleA05_ITD_SAMPLE_A05	4e614e4d9b70	Negative	0.00	
SampleA06_ITD_SAMPLE_A06	4e614e4d9b70	Negative	0.00	
SampleA07_ITD_SAMPLE_A07	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA08_ITD_SAMPLE_A08	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA09_ITD_SAMPLE_A09	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA10_ITD_SAMPLE_A10	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA11_ITD_SAMPLE_A11	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91

Report Comments
N/A

* Indicates additional notes on Sample Report

Figura 4. Ejemplo de Run Report (Informe de desarrollo).

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

Sample Report:

Sample and Run Information			
Sample Name	SampleA01 ITD_SAMPLE_A01		
Sample ID	21c1a415-6fad-4f69-af8e-535ad212c275		
Plate ID	9dd67e4f-d8d0-4016-b72c-f7179eaae829	Assay	ITD
Plate Barcode	01234	Analysis Date	2022-12-02 10:49:49 AM
Plate Name	UnitTestPlate		
Run ID	fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	Sample Pos/Neg/Fail	Positive

Controls				
Type	Name	ID	Pass/Fail	Fail Detail
PC	PControl1_ITD_PC_H01	08277bd1d8e5	Pass	
NTC	NTCControl1_ITD_NTC_F01	4a6bf004cd22	Pass	
EC	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	4e614e4d9b70	Pass	

Sample				
Sample Name	EC ID	Pos/Neg/Fail	Signal Ratio	Fail Detail
SampleA01_ITD_SAMPLE_A01	4e614e4d9b70	Positive	0.09	

Sample Notes	
N/A	

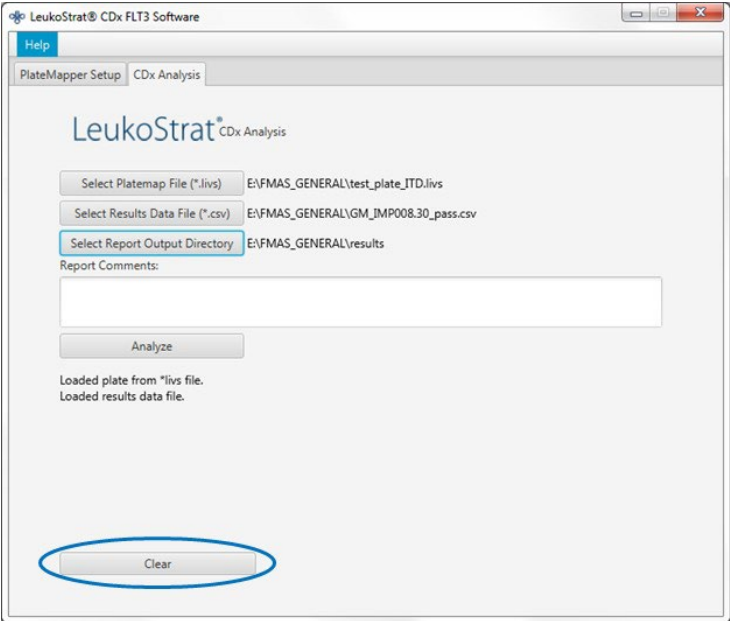
Report Comments	
N/A	

Figura 5. Ejemplo de Sample Report (Informe de la muestra).

Run ID	Assay	Run Result	Sample ID	Sample Type	EC ID	Sample Name	Sample Result	Signal Ratio	Sample Notes	Software Version
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	f7abf689-888c-4942-8202-08277bd1d8e5	PC		PControl1_ITD_PC_H01	POS	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	323a17c2-c7bf-4d57-9c96-4a6bf004cd22	NTC		NTControl1_ITD_NTC_F01	UNSET	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	EC	08b5ee54-77a5-4159-a028-11f364c3c963	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	NEG	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	21c1a415-f6ad-4f69-a8e-535ad212c275	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA01_ITD_SAMPLE_A01	POS	0.09		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	29533bf9-b916-48c9-8ec1-e74444ca2be5	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA02_ITD_SAMPLE_A02	POS	0.07		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	5a6a01c9-d38d-48ea-a433-aa347e01b72b	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA03_ITD_SAMPLE_A03	POS	0.11		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	76a3ae2d-417d-4690-92f6-55521e593a6f	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA04_ITD_SAMPLE_A04	NEG	0	Validation Sample Note	v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	dd33cd5b-aa6f-473b-8565-386398d84912	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA05_ITD_SAMPLE_A05	NEG	0		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	8cf778b8-0353-49c7-bf93-cf842fc77b3a	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA06_ITD_SAMPLE_A06	NEG	0		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	55265e37-070c-4e9d-a418-95d07099dbb	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA07_ITD_SAMPLE_A07	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	d3c89c59-d82-4c39-8504-23153e174140	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA08_ITD_SAMPLE_A08	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	b19bcd10-092c-47e1-bed1-fc0e30ed3dcf	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA09_ITD_SAMPLE_A09	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	ac125670-78fe-42df-ab0e-1acae7f4a9c2	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA10_ITD_SAMPLE_A10	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	7a3b21f1-c898-424a-bb66-72c79c6c5c13	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA11_ITD_SAMPLE_A11	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD

Figura 6. Ejemplo de CSV run export file (Archivo de exportación del desarrollo en CSV)

10.19.5. Haga clic en **Clear (Borrar)** para restaurar todos los campos.



10.19.6. Si no se obtienen resultados, asegúrese de que todos los pasos se hayan completado de la manera correcta. Consulte la Tabla 9 para conocer la resolución de problemas si aparecen errores. Si necesita asistencia adicional, póngase en contacto con el servicio técnico de Invivoscribe a través de support@invivoscribe.com.

Tabla 9: Mensajes de error y acciones correctivas

Mensaje de error al cargar los datos de resultados	Posibles causas	Acciones correctivas
- Unrecognized dye: <dye letter> (Colorante desconocido: <letra del colorante>). [AD01]	Se ha seleccionado un colorante que no se usa en el análisis con GeneMapper.	Para el análisis, seleccione R, G, B.
- No red dye detected. Please make sure red dye is selected during previous signal analysis step (No se ha detectado el colorante rojo. Asegúrese de seleccionar el colorante rojo en el paso previo al propio análisis). [AD02]	No se ha seleccionado el colorante rojo en el análisis con GeneMapper	Asegúrese de seleccionar el colorante rojo en el análisis con GeneMapper.
- Unrecognized data results file format (No se reconoce el formato del archivo de los resultados de datos). [AD03]	El archivo GeneMapper está dañado.	No edite el archivo GeneMapper de ningún modo.

Tabla 9: Mensajes de error y acciones correctivas

Mensaje de error al cargar los datos de resultados	Posibles causas	Acciones correctivas
- Unable to load LIVS <i>platemap file</i> ; incorrect format (No se puede cargar el archivo LIVS del mapa de la placa; formato incorrecto). [AD04]	El archivo LIVS está dañado.	No edite el archivo LIVS de ningún modo.
- Did not find run for runId <runId> (No se ha encontrado el desarrollo asociado al identificador <id. del desarrollo>). [AD05] - Did not find sample for sample name <sampleName> (No se ha encontrado la muestra asociada con el nombre <nombre de la muestra>). [AD06]	Se ha seleccionado un archivo LIVS incorrecto o el archivo LIVS está dañado.	Asegúrese de seleccionar el archivo LIVS correcto asociado con el análisis.
- General error loading results data file; please contact technical support (Error general al cargar el archivo de datos de resultados; póngase en contacto con el servicio técnico). [AD07]	Se ha producido un error desconocido.	Póngase en contacto con el servicio técnico.
- String index out of range: -1 (Índice de secuencia incorrecto: -1)	<Nombre de la muestra> no fue el primer atributo seleccionado al configurar la Convención del nombre del archivo (apartado 10.15.7).	Repita el desarrollo; comience en el apartado 10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> , e introduzca un nombre de archivo correcto.
- String index out of range: 15 (Índice de secuencia incorrecto: 15)	Se ha editado el archivo de resultados en CSV.	Repita la exportación del archivo de resultados en CSV desde DCS. No edite el archivo CSV de ningún modo.

11. Control de calidad

11.1. Validez del desarrollo

- 11.1.1. El software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* evalúa automáticamente los resultados.
- 11.1.2. Si el resultado del desarrollo es *Fail* (Error), no son válidos los resultados de las pruebas de desarrollo. La prueba deberá reiniciarse desde un punto u otro en función del *Fail Detail* (*Código de error*), (consulte el apartado 13, *Repetición de la prueba*).

11.2. Control de extracción y validez de las muestras

- 11.2.1. Es posible que haya muestras no válidas (*Error*) en un desarrollo válido. Si alguno de los controles de extracción no reúne los criterios de validez, las muestras asociadas con dicho control de extracción se considerarán *Fail* (*Errores*).
- 11.2.2. Es posible que también fallen muestras con controles válidos si no se reúnen las condiciones necesarias. La prueba deberá reiniciarse desde un punto u otro en función del *Fail Detail* (*Código de error*) que genere el software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* (consulte el apartado 13, *Repetición de la prueba*).

NOTA: Si se observan varios errores con el mismo tipo de *Fail Detail* (*Código de error*), la estrategia de repetición de la prueba es distinta de la estrategia por errores aislados del control o de la muestra (consulte el apartado 13, *Repetición de la prueba*).

12. Interpretación de los resultados

- 12.1. A los pacientes con LMA con una mutación por DIT o DTC en *FLT3* que se ajusta al valor de corte clínico se les indica un tratamiento con midostaurina o gilteritinib fumarato.
- 12.2. La relación de la señal mutada-sin mutar se calcula con el software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* y se evalúa de forma automática frente a un valor de corte clínico (punto de decisión médica) de **0,05**. La relación de la señal se corresponde con el área del pico de la señal mutada dividida entre el área del pico de la señal sin mutar. La relación de la señal mutada-sin mutar se expresa con dos cifras decimales.
- 12.3. Las mutaciones por DIT pueden portar distintas mutaciones; para calcular la señal mutada total, se suman las áreas del pico de todas las mutaciones. Asimismo, es posible que haya muestras que no contengan señal sin mutar (mutadas puras). En tal caso, el software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* contará la relación de la señal mutada-sin mutar como **100** y no indicará el valor de la relación.
- 12.4. Si la relación de la señal mutada-sin mutar para DIT o DTC de una muestra válida es igual o superior al valor de corte clínico (0,05), el resultado será **positivo** y se indicará la midostaurina o gilteritinib fumarato.
- 12.5. Si la relación de la señal mutada-sin mutar para DIT o DTC de una muestra válida es inferior al valor de corte clínico (0,05), el resultado será **negativo** y no se indicará la midostaurina o gilteritinib fumarato.
- 12.6. El estado de mutación de las muestras se define a través de las reglas que figuran en la Tabla 10.

Tabla 10: Determinación del estado de mutación de la muestra

Supuesto	Resultado del software para DIT	Relación de la señal para DIT	Resultado del software para DTC	Relación de la señal para DTC	Resultado final de la prueba
1	Positive (Positivo)	≥0,05	Positive (Positivo)	≥0,05	Positive (Positivo)
2	Negative (Negativo)*	<0,05	Negative (Negativo)	<0,05	Negative (Negativo)
3	Invalid (No válido)	N. P.	Invalid (No válido)	N. P.	Invalid (No válido)
4	Positive (Positivo)	≥0,05	Negative (Negativo)	<0,05	Positive (Positivo)
5	Negative (Negativo)*	<0,05	Positive (Positivo)	≥0,05	Positive (Positivo)
6	Positive (Positivo)	≥0,05	Invalid (No válido)	N. P.	Positive (Positivo)
7	Negative (Negativo)*	<0,05	Invalid (No válido)	N. P.	Invalid (No válido)
8	Invalid (No válido)	N. P.	Positive (Positivo)	≥0,05	Positive (Positivo)
9	Invalid (No válido)	N. P.	Negative (Negativo)	<0,05	Invalid (No válido)

* Una relación de la señal ≥0,01 e inferior a 0,05 para DIT representa una mutación real, pero está por debajo del valor de corte clínico.
** Una relación de la señal ≥0,03 e inferior a 0,05 para DTC representa una mutación real, pero está por debajo del valor de corte clínico.

- 12.7. En el informe que genera el software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* aparecen los códigos de error; repita el desarrollo o el análisis de las muestras de acuerdo con las instrucciones que figuran en el apartado 13.4.
- 12.8. Si el dispositivo no funciona del modo previsto o no interpreta correctamente los resultados de la prueba, los resultados de la mutación de *FLT3* podrían ser incorrectos, lo que afectaría a las decisiones terapéuticas contra la LMA.
 - 12.8.1. Un resultado falso negativo haría que el paciente con LMA no experimentara los beneficios asociados con el tratamiento con midostaurina (RYDAPT®). Sin embargo, el paciente se sometería a una quimioterapia intensa, que es el tratamiento de referencia para la LMA de diagnóstico reciente.
 - 12.8.2. Un paciente con un resultado falso positivo se trataría con RYDAPT (midostaurina), que no aportaría los beneficios esperados. Para conocer los acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento con la midostaurina, consulte la ficha técnica de RYDAPT, fabricado por Novartis AG.

13. Repetición de la prueba

13.1. Desarrollos no válidos

- 13.1.1. El desarrollo no es válido si el control positivo, el control sin molde o ambos no reúnen las condiciones de validez. Repita el desarrollo con todas las muestras, el control positivo, todos los controles de extracción asociados y el control sin molde. Los desarrollos para DIT y DTC deben ser independientes.
- 13.1.2. Repita el desarrollo en función de lo que se indica en la Tabla 11 o en la Tabla 12, la prueba y los datos específicos del error, que figuran en el apartado *Controles* de los informes del software (software) LeukoStrat CDx FLT3. Los códigos de error de un control positivo o un control sin molde prevalecen sobre todos los códigos de error de un control de extracción y una muestra.

13.2. Control de extracción no válido en desarrollos válidos

- 13.2.1. Si se produjera un error del control de extracción en un desarrollo válido con distintos controles de extracción, vuelva a analizar todos los controles de extracción, las muestras asociadas, el control positivo y el control sin molde del desarrollo para DIT o DTC. Repita la prueba en función de lo que se indica en la Tabla 11 o en la Tabla 12, la prueba y los datos específicos del error, que figuran en el apartado *Controls (Controles)* de los informes del software (software) LeukoStrat CDx FLT3. Los códigos de error de un control de extracción prevalecen sobre los códigos de error de una muestra.

13.3. Muestras no válidas en desarrollos válidos

- 13.3.1. Si se produjera un error de la muestra en un desarrollo válido, vuelva a analizar las muestras, el control positivo, los controles de extracción, las muestras asociadas con la muestra fallida y el control sin molde del desarrollo para DIT o DTC. Repita la prueba en función de lo que se indica en la Tabla 11 o en la Tabla 12, la prueba y los datos específicos del error, que figuran en el apartado *Samples (Muestras)* de los informes del software (software) LeukoStrat CDx FLT3. Si se vuelve a analizar una muestra, debe volver a analizarse el control de extracción asociado.

13.4. Códigos de error y repetición de la prueba

- 13.4.1. La Tabla 11 y la Tabla 12 recogen los datos de repetición de las pruebas de acuerdo con los códigos de error por tipo de muestra para DIT y DTC, respectivamente. Consulte la Tabla 13 para conocer los códigos de repetición que aparecen en la Tabla 11 y la Tabla 12.
- 13.4.2. El algoritmo de repetición es el siguiente:
 - 1) Control positivo (CP) o control sin molde (CSM) para DIT o DTC no válidos (consulte el apartado 13.1).
 - 2) Control de extracción (CE) no válido en un desarrollo válido (consulte el apartado 13.2).
 - 3) Muestras no válidas en un desarrollo válido (consulte el apartado 13.3).

La Figura 7 recoge un algoritmo de repetición de la prueba.

- 13.4.3. Si se produce más de un error en una sola muestra o control, repita la prueba; asegúrese de que el operario comience por el paso más cercano al inicio del procedimiento.
 - 13.4.3.1. Si se obtiene el mismo código de error en el mismo control/muestra, continúe con el siguiente punto de inicio de la repetición, si se encuentra en la lista. Si vuelve a obtenerse el mismo código de error después de que se hayan completado todas las acciones de resolución de problemas, el resultado del control/muestra no es válido.
 - 13.4.3.2. Si la repetición da lugar a un tipo de error distinto al inicial, siga la acción correctiva descrita para el nuevo tipo de error de repetición de la prueba.

NOTA: No podrá repetir más de cuatro veces el análisis de un solo control o muestra.

- 13.4.4. Las muestras no válidas se evalúan de forma independiente; por lo tanto, si se identifican muestras con distintos códigos de error en un mismo desarrollo, repita la prueba correspondiente a cada muestra.

NOTA: Si necesita asistencia adicional, póngase en contacto con el servicio técnico de Invivoscribe a través de support@invivoscribe.com.

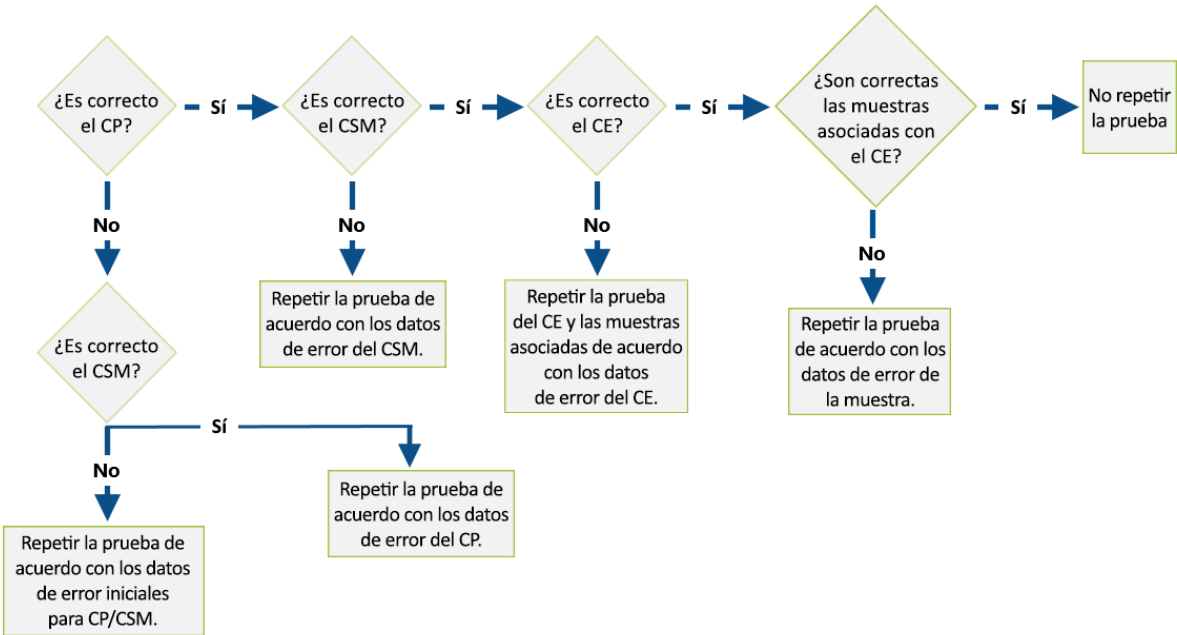


Figura 7. Árbol lógico de repetición de la prueba

Tabla 11: Repetición de la prueba: controles y muestras para DIT

Código de error para DIT	Controles			Muestras	
	CP	CSM	CE	Muestra pos.	Muestra neg.
IR05: Sample or Control Failed (Error de la muestra o del control).	Amp		Amp		Quant/Proc
IR06: Sample or Control Failed (Error de la muestra o del control).	Amp				Quant/Proc
IR07: Sample Failed (Error de la muestra).				CE-DS	CE-DS
IR09: Sample or Control Failed (Error de la muestra o del control).	CE	CE	CE	CE/Proc	CE/Proc
IR12: Sample or Control Failed (Error de la muestra o del control).	Amp		Q-Amp	Quant/Proc	Quant/Proc
IR13: Control Failed (Error del control).	CE				
IR20: Control Failed (Error del control).				Ctrl	Ctrl
IR21: Control Failed (Error del control).				Ctrl	Ctrl
IR31: Control Failed (Error del control).	Amp				
IR32: Control Failed (Error del control).	CE/Amp				
IR33: Control Failed (Error del control).	CE/Amp				
IR34: Control Failed (Error del control).	Amp				
IR40: Control Failed (Error del control).		Amp			
IR51: Control Failed (Error del control).			Q-Amp		
IR52: Control Failed (Error del control).			EC/Q-Amp		
IR53: Control Failed (Error del control).				Ctrl	Ctrl
IR70: Sample Failed (Error de la muestra).				CE/Proc	
IR80: Sample Failed (Error de la muestra).					Quant/Proc
IR91: Sample or Control Failed (Error de la muestra o del control).	CE	CE	CE	CE	CE

Tabla 12: Repetición de la prueba: controles y muestras para DTC

Código de error para DTC	Controles			Muestras	
	CP	CSM	CE	Muestra pos.	Muestra neg.
TR07: Sample or Control Failed (Error de la muestra o del control).	Dig		Dig		Dig/Proc
TR09: Sample or Control Failed (Error de la muestra o del control).	CE	CE	CE	CE/Proc	CE/Proc
TR12: Sample or Control Failed (Error de la muestra o del control).	Amp		Q-Amp	Quant/Proc	Quant/Proc
TR20: Control Failed (Error del control).				Ctrl	Ctrl
TR21: Control Failed (Error del control).				Ctrl	Ctrl
TR30: Control Failed (Error del control).	Xtalk/Amp				
TR31: Control Failed (Error del control).	CE/Amp				
TR32: Control Failed (Error del control).	CE/Amp				
TR33: Control Failed (Error del control).	Amp				
TR40: Control Failed (Error del control).		Amp			
TR50: Control Failed (Error del control).			Xtalk/Q-Amp		
TR51: Control Failed (Error del control).			CE/Q-Amp		
TR52: Control Failed (Error del control).			Dig		
TR53: Control Failed (Error del control).				Ctrl	Ctrl
TR70: Sample Failed (Error de la muestra).				Xtalk/Quant/Proc	
TR71: Sample Failed (Error de la muestra).				CE/Proc	
TR72: Sample Failed (Error de la muestra).				Dig/Proc	
TR80: Sample Failed (Error de la muestra).					Xtalk/Quant/Proc
TR81: Sample Failed (Error de la muestra).					Quant/Proc
TR93: Sample or Control Failed (Error de la muestra o del control).	CE	CE	CE	CE	CE

Tabla 13: Códigos de repetición

Código de repetición de la prueba	Descripción	Punto de inicio de la repetición
Amp	Repita desde la fase de amplificación y utilice diluciones previas de muestras de ADN.	10.10. <i>Amplificación</i>
CE	Repita desde la fase de electroforesis capilar. Prepare una nueva placa para EC con un amplicón nuevo (procedente de la placa para PCR por DIT o DTC) y asegúrese de incluir también el control positivo, el control sin molde y los controles de extracción asociados. Detenga la repetición de la prueba por artefactos si el artefacto tiene el mismo tamaño en dos desarrollos seguidos. Los artefactos de diferentes tamaños se consideran tipos de error únicos.	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i>
CE/Amp CE/Q-Amp	Repita la prueba siguiendo las instrucciones indicadas para el código de repetición CE. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, repita la prueba una vez más siguiendo las instrucciones indicadas en Amp o Q-Amp.	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> 10.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> 10.10. <i>Amplificación</i>
CE/Proc	Repita la prueba siguiendo las instrucciones indicadas para el código de repetición CE. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, vuelva a procesar la muestra desde la fase relativa a la sangre periférica o al aspirado de médula ósea.	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> 10.2. <i>Preparación para el procesamiento de la muestra</i>
Amp	Repita desde la fase de amplificación y utilice diluciones previas de muestras de ADN.	10.10. <i>Amplificación</i>
CE	Repita desde la fase de electroforesis capilar. Prepare una nueva placa para EC con un amplicón nuevo (procedente de la placa para PCR por DIT o DTC) y asegúrese de incluir también el control positivo, el control sin molde y los controles de extracción asociados. Detenga la repetición de la prueba por artefactos si el artefacto tiene el mismo tamaño en dos desarrollos seguidos. Los artefactos de diferentes tamaños se consideran tipos de error únicos.	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i>
CE/Amp CE/Q-Amp	Repita la prueba siguiendo las instrucciones indicadas para el código de repetición CE. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, repita la prueba una vez más siguiendo las instrucciones indicadas en Amp o Q-Amp.	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> 10.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> 10.10. <i>Amplificación</i>
CE/Proc	Repita la prueba siguiendo las instrucciones indicadas para el código de repetición CE. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, vuelva a procesar la muestra desde la fase relativa a la sangre periférica o al aspirado de médula ósea.	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> 10.2. <i>Preparación para el procesamiento de la muestra</i>
CE-DS	Repita desde la fase de electroforesis capilar. Prepare una nueva placa para EC con un amplicón nuevo (procedente de la placa para PCR por DIT o DTC) y asegúrese de incluir también el control positivo, el control sin molde y los controles de extracción asociados. Si se genera el mismo código de error (IR07), el resultado de la muestra es válido y notificable (consulte el apartado 13.6. <i>Cambio de colorante</i>).	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i>
Ctrl	Repita la prueba siguiendo las instrucciones relativas al control que generó el error.	Varía
Dig	Repita desde la fase de digestión; utilice un amplicón nuevo (procedente de la placa para PCR por DTC), los controles de extracción asociados y los controles necesarios.	10.11. <i>Digestión con la enzima de restricción (solo para mutados en el DTC)</i>
Dig/Proc	Repita la prueba siguiendo las instrucciones relativas al código de repetición Dig. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, vuelva a procesar la muestra desde la fase relativa a la sangre periférica o al aspirado de médula ósea.	10.11. <i>Digestión con la enzima de restricción (solo para mutados en el DTC)</i> 10.2. <i>Preparación para el procesamiento de la muestra</i>

Tabla 13: Códigos de repetición

Código de repetición de la prueba	Descripción	Punto de inicio de la repetición
Q-Amp	Repita desde la fase de cuantificación de los controles de extracción y utilice diluciones previas de la muestra de ADN.	10.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> 10.10. <i>Amplificación</i> (muestras)
Quant	Repita desde la fase de cuantificación de las muestras y los controles de extracción asociados.	10.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i>
Quant/Proc	Repita la prueba siguiendo las instrucciones relativas al código de repetición Quant. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, vuelva a procesar la muestra desde la fase relativa a la sangre periférica o al aspirado de médula ósea.	10.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> 10.2. <i>Preparación para el procesamiento de la muestra</i>
Xtalk/Amp Xtalk/Q-Amp Xtalk/Quant/Proc	Coloque una nueva placa para EC, de modo que las muestras estén separadas mediante 5 capilares vacíos (es decir, cargue las muestras en los pocillos A01, C01, E01 y G01 en la inyección 1; cargue las muestras en dichos pocillos en el resto de las inyecciones). Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, repita la prueba una vez más siguiendo las instrucciones indicadas en Amp, Q-Amp o Quant. Si la repetición de acuerdo con Quant da lugar al mismo código de error, vuelva a procesar la muestra desde la fase relativa a la sangre periférica o al aspirado de médula ósea.	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> 10.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> (controles de extracción) 10.10. <i>Amplificación</i> (muestras, CP) 10.2. <i>Preparación para el procesamiento de la muestra</i>

13.5. Varios errores en un mismo desarrollo

- 13.5.1. Suelen observarse errores aislados en muestras y controles, pero también pueden observarse códigos de error en varios o todos los pocillos. Cuando se produzca este tipo de error, repita el desarrollo con todas las muestras, el control positivo, los controles de extracción asociados y el control sin molde de acuerdo con la Tabla 14; los códigos de repetición se recogen en la Tabla 15.
- 13.5.2. Las acciones correctivas adicionales pueden abarcar las siguientes instrucciones:

13.5.2.1. Asegúrese de que la configuración del método de análisis y la configuración del patrón, entre otras configuraciones del software GeneMapper, sean correctas.

13.5.2.2. Asegúrese de que se hayan seguido las instrucciones que figuran en el apartado GeneMapper, pues saltarse cualquier instrucción, como el uso del botón verde de reproducción, puede generar resultados erróneos.

13.5.2.3. Abra el archivo CSV para confirmar que contiene los resultados de todas las muestras y controles a los que se haya asociado un archivo FSA en el 3500xL.

13.5.2.4. Asegúrese de que, en el archivo CSV, estén las columnas necesarias, los límites máximos sean los adecuados (es decir, no debe haber picos inferiores a 100 en azul o verde ni inferiores a 50 en rojo) y las columnas contengan números distintos de cero.

13.5.2.5. Consulte el electroferograma que viene con el software GeneMapper para visualizar la presencia, la forma y el tamaño del pico.

Tabla 14: Repetición, varios errores en un mismo desarrollo

Tipo de muestra	Código de error	Código de repetición
CP: DIT	IR31	Amp.
CSM: DIT	IR40	
CE: DIT	IR51	
CP: DTC	TR30	
CSM: DTC	TR40	
CE: DTC	TR50	
CP: DIT	IR33	EC/amp.
Muestra: DIT	IR70	
CP: DTC	TR32	
Muestra: DTC	TR71	
CP: DIT	IR32	

Tabla 14: Repetición, varios errores en un mismo desarrollo

Tipo de muestra	Código de error	Código de repetición
CE: DIT	IR52	EC/amp.
Muestra: DIT	IR80	
CP: DTC	TR31	
CE: DTC	TR51	
Muestra: DTC	TR81	
Todos los DIT en una inyección	IR91	EC-SP
Todos los DTC en una inyección	TR93	
Todos los DIT en un desarrollo	IR04	GM
Todos los DTC en un desarrollo	TR04	

Tabla 15: Códigos de repetición, repetición por errores múltiples

Código de repetición	Descripción	Punto de inicio de la repetición
Analysis/Amp (Análisis/amp.)	Repita la prueba en GeneMapper y asegúrese de pulsar el botón de reproducción verde al analizar los datos (apartado 10.18.6). Si la repetición de la prueba en GeneMapper arroja el mismo resultado, repita desde la fase de amplificación y utilice diluciones previas de ADN de la muestra. Asegúrese de introducir los tubos en el agitador vortical y de añadir la Taq.	10.18. <i>Análisis de datos con el software GeneMapper</i> 10.10. <i>Amplificación</i>
Amp (Amp.)	Repita desde la fase de amplificación y utilice diluciones previas de ADN de la muestra. Asegúrese de introducir los tubos en el agitador vortical y de añadir la Taq.	10.10. <i>Amplificación</i>
CE (EC)	Repita desde la fase de electroforesis capilar. Prepare una nueva placa para EC con un amplicón nuevo (procedente de la placa para PCR por DIT o DTC) y una solución patrón nueva. Asegúrese de que el control positivo, el control sin molde y los controles de extracción asociados también estén presentes en la placa que contiene la muestra fallida.	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i>
CE/Amp (EC/amp.)	Repita la prueba siguiendo las instrucciones indicadas para el código de repetición EC. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, repita la prueba una vez más siguiendo las instrucciones indicadas en Amp. o C-amp.	10.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> (controles de extracción) 10.10. <i>Amplificación</i> (muestras)
CE-SS (EC-SP)	Repita desde la fase de electroforesis capilar y utilice una solución patrón nueva.	10.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i>
GM (GM)	Vuelva a crear los archivos de datos de exportación con el software GeneMapper y asegúrese de fijar los límites en 100 URF.	10.18. <i>Análisis de datos con el software GeneMapper</i>

13.6. Cambio de colorante

En escasas ocasiones, en presencia de insertos en DTC de gran tamaño, el software (software) LeukoStrat CDx *FLT3* puede confirmar de forma errónea un pico mutado. El código de error **IR07** no tiene por qué corresponder a un resultado no válido. Para confirmar el cambio de colorante, repita la electroforesis capilar con una placa para EC nueva y un amplicón nuevo procedente de la placa para PCR por DIT. Si vuelve a salir el código de error **IR07**, el resultado de la muestra es válido y notificable.

14. Limitaciones de procedimiento

- 14.1. Analice solo los tipos de muestras indicados; la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se ha validado para usarse exclusivamente con sangre periférica y aspirado de médula ósea. La fiabilidad de los resultados depende de la conservación y el procesamiento de las muestras. Por lo tanto, siga los procedimientos que figuran en este documento.
- 14.2. Para validar la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, se ha utilizado el DNA Blood Mini Kit (Minikit de ADN en sangre) QIAamp® DSP para extracción de ADN genómico.
- 14.3. La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay detecta mutaciones por DIT de entre 3 pb y 323 pb. Sin embargo, la prueba se ha validado para detectar únicamente mutaciones de entre 30 pb y 279 pb.
- Los insertos en DIT de entre 3 pb y 30 pb aparecen como mutaciones por DIT.
Los insertos en DIT de entre 279 pb y 323 pb aparecen como mutaciones por DIT.
Los insertos en DIT con un tamaño mayor de 323 pb no aparecen como insertos.
- 14.4. La prueba no detecta aquellas mutaciones de *FLT3* que no se ajusten al nivel de sensibilidad de la prueba.
- 14.4.1. Para los insertos en DIT de entre 30 pb y 126 pb, una relación alélica de 0,08 dará lugar a un resultado positivo en la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 14.4.2. Para los insertos en DIT de entre 129 pb y 279 pb, una relación alélica de 1 dará lugar a un resultado positivo en la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 14.4.3. Para las mutaciones en DTC que modifiquen el lugar de la EcoRV, una relación alélica de 0,18 dará lugar a un resultado positivo en la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 14.5. Interprete los resultados de la prueba en el contexto de los datos clínicos y de las demás pruebas realizadas a los pacientes.
- 14.6. La detección de una mutación depende del número de copias de la secuencia mutada y puede verse afectada por la integridad de la muestra, la cantidad de ADN aislado y la presencia de sustancias interferentes. Las pruebas de tipo PCR están sujetas a interferencia por degradación del ADN o inhibición de la PCR por EDTA y otros compuestos.
- 14.7. El uso del producto debe limitarse a técnicos que conozcan las técnicas de PCR y la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 14.8. La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay es una prueba cualitativa. La prueba no se ha diseñado para realizar mediciones cuantitativas de mutaciones por DIT o DTC.

14.9. No puede calcularse, medirse ni determinarse la relación alélica de la muestra utilizando esta prueba. \]

15. Valores esperados

15.1. Tamaño previsto de los productos amplificados

15.1.1. El tamaño del amplicón se determinó utilizando un equipo 3500xL (Tabla 16).

NOTA: Con “Colorante”, se hace referencia al color que adoptan los productos con la mezcla maestra cuando se utiliza la asignación de colores predeterminada en los sistemas de detección por fluorescencia ABI.

Tabla 16: Tamaño previsto del amplicón

Mezcla maestra	Núm. de pieza	Diana	Colorante	ADN de control	Tamaño del producto en nucleótidos
<i>FLT3</i> : DIT	R0880060 R0880080	Exones 14 y 15	Azul y verde	Intervalo de tamaño válido ADN de control positivo: DIT para <i>FLT3</i> ADN de control de extracción: <i>FLT3</i>	326-650 327±1, 357±1 327±1
<i>FLT3</i> : DTC	R0880070 R0880080	Exón 20	Azul	Intervalo de tamaño válido ADN de control positivo: DTC para <i>FLT3</i> ADN de control de extracción: <i>FLT3</i>	78-80, 124-128 79±1, 127±1 79±1, 127±1

16. Evaluación del rendimiento no clínico

16.1. Todo el conjunto evaluable

La precisión de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se determinó comparando los resultados de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay con los de un método de secuenciación de alto rendimiento validado en un ensayo clínico. Para el estudio de comparación de métodos, se utilizó un subconjunto de muestras del estudio de transferencia de *FLT3* que incluía todas las muestras disponibles y evaluables positivas para la mutación *FLT3* (EC+) y aproximadamente 300 muestras negativas para la mutación *FLT3* (EC-). El subconjunto de muestras negativas se seleccionó mediante un algoritmo de aleatorización; la proporción de cada centro de pruebas del EC se correspondía con la proporción de dicho centro a nivel global en el estudio A2301. Se incluyeron 505 muestras EC+ y 263 muestras EC- para un total de 768 muestras de pacientes. Cuatro de ellas presentaban una cantidad insuficiente de ADN y se analizaron teniendo en cuenta la desviación. De los 764 resultados, 487 fueron positivos y 230 fueron negativos para *FLT3* de acuerdo con las dos pruebas, como se indica en la Tabla 17. La Tabla 18 recoge la concordancia con y sin resultados no válidos.

Tabla 17: Concordancia entre CDx y la secuenciación de alto rendimiento para todas las muestras

CDx	Secuenciación		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	487	6	493
Negativo	31	230	261
No válido	7	3	10
Total	525	239	764

Tabla 18: Concordancia entre CDx y la secuenciación de alto rendimiento

Medida de concordancia	Sin CDx no válido		Con CDx no válido	
	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95 % ⁽¹⁾	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95 % ⁽¹⁾
PPA	94,0 % (487/518)	(91,6-95,9 %)	92,8 % (487/525)	(90,2-94,8 %)
NPA	97,5 % (230/236)	(94,5-99,1 %)	96,2 % (230/239)	(93,0-98,3 %)
OPA	95,1 % (717/754)	(93,3-96,5 %)	93,8 % (717/764)	(91,9-95,4 %)

⁽¹⁾El IC del 95 % se calcula utilizando el método exacto de Clopper-Pearson.

FLT3 por DIT: Con población con mutación por DIT, se hace referencia a las muestras que solo contienen mutaciones por DIT según la secuenciación. El 64 % de las 378 muestras de DIT solo presentó una (1) variante de DIT; el resto contenía varias mutaciones por DIT. Los insertos de DIT presentaron tamaños de entre 3 pb y 209 pb. La mayor parte de las muestras con mutaciones por DIT presentaron insertos de un tamaño inferior a 100 pb (>85 %). Treinta y siete (37) de las muestras de DIT presentaron insertos de un tamaño superior o igual a 100 pb. La Figura 8 recoge la distribución de tamaños de las DIT.

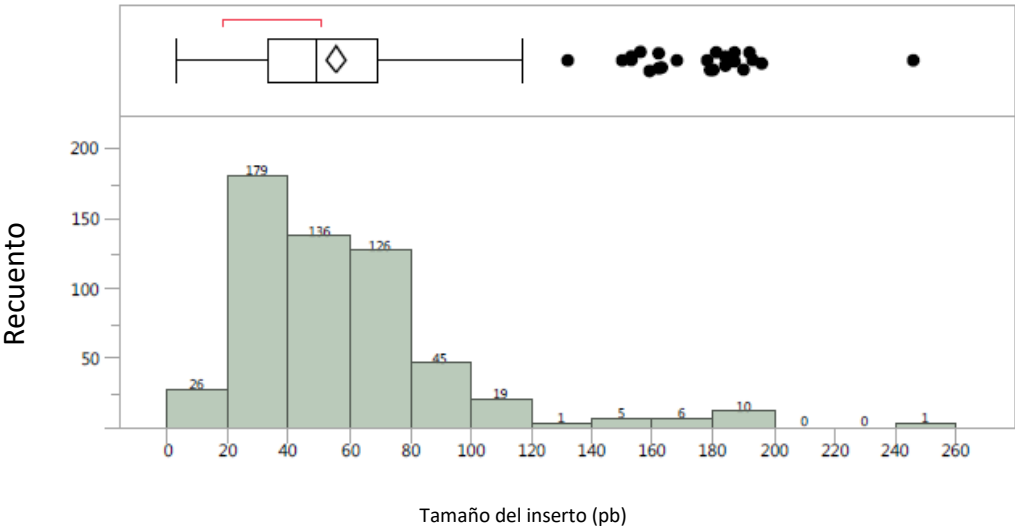


Figura 8: Distribución de tamaños de los insertos de DIT mediante CDx (381 muestras positivas, N de tamaños del inserto = 554, media = 55,6).

Nueve de los pacientes no obtuvieron resultados válidos para DIT con el CDx. Hubo 57 resultados discordantes entre las 764 muestras analizadas. De los 57 resultados discordantes, 50 mostraron lecturas de fracción de variantes bajas mediante secuenciación y CDx notificó un resultado negativo para la mutación de acuerdo con el valor de corte clínico (RS = 0,05). Los cálculos porcentuales de PPA, NPA y OPA son 86,8 %, 97,3 % y 91,4 % respectivamente, incluidos los resultados no válidos de CDx (tabla 19). Sin los resultados no válidos de CDx, PPA, NPA y OPA se ajustan a un valor del 88 % o más.

Tabla 19: Concordancia sobre DIT en CDx y secuenciación para los resultados de *FLT3* por DIT

Medida de concordancia	Sin CDx no válido		Con CDx no válido	
	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95 % ⁽¹⁾	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95 % ⁽¹⁾
PPA	88,0 % (375/426)	(84,6-91,0 %)	86,8 % (375/432)	(83,2-89,9 %)
NPA	98,2 % (323/329)	(96,1-99,3 %)	97,3 % (323/332)	(94,9-98,8 %)
OPA	92,5 % (698/755)	(90,3-94,2 %)	91,4 % (698/764)	(89,1-93,3 %)

⁽¹⁾El IC del 95 % se calcula utilizando el método exacto de Clopper-Pearson.

FLT3 en DTC: Con población con mutación en DTC, se hace referencia a las muestras que solo contienen mutaciones en DTC según la secuenciación de alto rendimiento. El 79 % de las 94 muestras de DTC solo contenía una (1) variante de DTC (sustitución o delección), mientras que 20/94 (el 21 %) contenían dos variantes de DTC. Como era de esperar, la mutación predominante fue la sustitución de un solo nucleótido en el codón D835, principalmente como D835Y. También se observaron mutaciones D835H, D835V e I836S, con una menor prevalencia. El 13 % de las muestras positivas para DTC contenía la variante de delección en I836 únicamente como delección o como delección y sustitución.

Ciento treinta y siete (92,6 %) de las 148 muestras que dieron positivo para la mutación en DTC de acuerdo con la secuenciación, dieron positivo para la mutación en DTC de acuerdo con la prueba CDx. Seiscientos once (98,2 %) de las 616 muestras que dieron negativo para la mutación en DTC mediante secuenciación, dieron negativo para la mutación en DTC de acuerdo con la prueba CDx. Ocho muestras arrojaron resultados no válidos para la mutación en DTC de acuerdo con la prueba CDx y ocho de las 764 muestras analizadas fueron discordantes. Los ocho resultados discordantes presentaron lecturas de fracción de variantes bajas mediante secuenciación de alto rendimiento. La RS del resultado negativo para la mutación de acuerdo con la prueba CDx no alcanzó el valor de corte. La Tabla 20 recoge los resultados de concordancia sobre DTC con y sin CDx no válido.

Tabla 20: Concordancia sobre DTC en CDx y secuenciación para los resultados de FLT3 en DTC

Medida de concordancia	Sin CDx no válido		Con CDx no válido	
	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95 % ⁽¹⁾	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95 % ⁽¹⁾
PPA	94,5 % (137/145)	(89,4-97,6 %)	92,6 % (137/148)	(87,1-96,2 %)
NPA	100,0 % (611/611)	(99,4-100,0 %)	99,2 % (611/616)	(98,1-99,7 %)
OPA	98,9 % (748/756)	(97,9-99,5 %)	97,9 % (748/764)	(96,6-98,8 %)

⁽¹⁾El IC del 95 % se calcula utilizando el método exacto de Clopper-Pearson.

Los resultados relativos a la sangre periférica se analizaron con independencia de los relativos a la médula ósea y demostraron ser comparables.

16.2. Sensibilidad analítica: límite del blanco (LB)

Cuando, en la LeukoStrat CDx FLT3 Mutation Assay, se analizaron muestras con ADN exclusivamente no mutado (es decir, blanco mutado), la RS fue de 0,00 en la prueba de DIT y de entre 0,00 y 0,01 en la prueba de DTC. El límite del blanco es muy inferior al valor de corte clínico: RS de 0,05.

16.3. Sensibilidad analítica

El LD (límite de detección) de la prueba se evaluó en dos estudios. En el primer estudio, se usaron muestras artificiales creadas mezclando estirpes celulares con sangre completa pobre en leucocitos. Se usaron muestras de estirpes celulares para representar los tres tamaños de insertos de DIT: insertos de 30 pb, insertos de 126 pb e insertos de 279 pb, como se indica en la tabla 21. Se usaron muestras de estirpes celulares para representar los tres tamaños de insertos de DTC: insertos de 30 pb, insertos de 126 pb e insertos de 279 pb y una mutación D835 en DTC. El ADN se diluyó en 5 ng/μl, 10 ng/μl y 15 ng/μl; se analizaron dos relaciones alélicas (RA) por cada estirpe celular. Se realizó un segundo estudio con muestras clínicas para confirmar las observaciones para el LD relativas a las estirpes celulares. Se diluyeron cinco muestras clínicas y varias muestras clínicas negativas para generar una relación de señal objetivo (RSO) que se ajustara al intervalo lineal de la curva patrón de la estirpe celular en cuestión (Tabla 21). Cada muestra se diluyó en 5 niveles de relación de señal para representar un bajo negativo (BN), alto negativo (AN), cerca del valor de corte (VC), bajo positivo (BP) y medio positivo (MP). Estas muestras, en intervalo lineal, se analizaron mediante la LeukoStrat CDx FLT3 Mutation Assay, que determinó el valor medio de la RS. Un operario acostumbrado a usar el equipo analizó 20 veces cada dilución de las muestras clínicas del LD por nivel de dilución durante cuatro días no consecutivos (5 réplicas al día). Se calculó la RA de las diluciones de las muestras clínicas del LD utilizando la RA calculada en las curvas patrón de las estirpes celulares. Se calculó la RA de las muestras clínicas del LD basándose en que el estudio reuniría los siguientes criterios de aceptación:

- 16.3.1. En presencia de mutaciones de FLT3, la RS y la RA deben poder detectarse por encima del límite del blanco (LB) en ≥95 % de las réplicas (LD analítico).
- 16.3.2. La RA debe ser cercana al valor de corte clínico y la RS debe ser de 0,04-0,06 (valor de corte).
- 16.3.3. La RA y la RS deben poder detectarse por encima del valor de corte clínico en ≥95 % de las réplicas (por encima del valor de corte).

Tabla 21: RS, RA y LD por cada muestra y nivel de dilución

Id. de la muestra	Mutación	Nivel	RSO	RS media	RA de la mezcla	N válido	N (%) RS > LB	N (%) RS > 0,05	*Clasificación
DTC CS1	DTC: I836	BN	0,02	0,02	0,039	20	20 (100,0)	0	LD del análisis
		AN	0,03	0,03	0,057	20	20 (100,0)	0	-
		VC	0,05	0,05	0,094	20	20 (100,0)	16 (80,0 %)	Valor de corte
		BP	0,08	0,07	0,144	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Por encima del valor de corte
		MP	0,13	0,12	0,224	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-

Tabla 21: RS, RA y LD por cada muestra y nivel de dilución

Id. de la muestra	Mutación	Nivel	RSO	RS media	RA de la mezcla	N válido	N (%) RS > LB	N (%) RS > 0,05	*Clasificación
DTC CS2	DTC: D835	BN	0,01	0,02	0,023	20	20 (100,0)	0	LD del análisis
		AN	0,02	0,03	0,047	20	20 (100,0)	0	-
		VC	0,04	0,05	0,089	20	20 (100,0)	19 (95,0)	Valor de corte Por encima del valor de corte
		BP	0,07	0,08	0,152	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
		MP	0,13	0,15	0,269	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
DIT CS1	DIT: 24 pb	BN	0,02	0,02	0,044	20	20 (100,0)	0	LD del análisis
		AN	0,03	0,03	0,065	20	20 (100,0)	0	-
		VC	0,05	0,05	0,107	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Valor de corte Por encima del valor de corte
		BP	0,08	0,08	0,165	20	19 (95,0)	19 (95,0)	-
		MP	0,13	0,13	0,257	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
DIT CS2	DIT: 66 pb	BN	0,02	0,02	0,045	20	20 (100,0)	0	LD del análisis
		AN	0,03	0,03	0,066	20	20 (100,0)	0	-
		VC	0,05	0,05	0,110	20	20 (100,0)	18 (90,0)	Valor de corte
		BP	0,09	0,08	0,189	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Por encima del valor de corte
		MP	0,14	0,13	0,280	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
DIT CS3	DIT: 217 pb	BN	0,01	0	0,073	20	2 (10,0)	0	-
		AN	0,02	0,02	0,147	20	15 (75,0)	0	-
		VC	0,04	0,04	0,276	20	20 (100,0)	9 (45,0)	LD del análisis Valor de corte
		BP	0,08	0,08	0,539	20	19 (95,0)	19 (95,0)	Por encima del valor de corte
		MP	0,13	0,13	0,838	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
DIT neg. real	Ninguna	TN	N. P.	0	0	20	0	0	N. P.
DTC neg. real	Ninguna	TN	N. P.	0	0	20	0	0	N. P.

*Las clasificaciones se definen del siguiente modo: 1. LD analítico = RA más baja; el 95 % de las veces, las muestras se detectaron por encima del LB. 2. El valor de corte es la RA; las muestras presentaron una RS cercana a 0,05. 3. Por encima del valor de corte = RA más baja; el 95 % de las veces, las muestras se detectaron por encima de una RS de 0,05.

La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay es capaz de detectar las siguientes relaciones alélicas mutadas-no mutadas en el valor de corte clínico de los siguientes tipos de mutación:

- 16.3.4. Para los insertos en DIT de 24 pb, se detectó una relación alélica de 0,107 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 7,1 %.
- 16.3.5. Para los insertos en DIT de 66 pb, se detectó una relación alélica de 0,189 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 7,1 %.
- 16.3.6. Para los insertos en DIT de 217 pb, se detectó una relación alélica de 0,539 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 25,6 %.
- 16.3.7. Para las mutaciones D835 en DTC que destruyen el sitio de la EcoRV, se detectó una relación alélica de 0,089 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 4,5 %.
- 16.3.8. Para las mutaciones I836 en DTC que destruyen el sitio de la EcoRV, se detectó una relación alélica de 0,144 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 5,7 %.

La tabla 22 recoge la conversión de valores de RA en % de mutaciones.

Tabla 22: Sensibilidad analítica, relación alélica y % de mutación

Id. de la muestra	Mutación	Clasificación de la mutación	Por encima del valor de corte del 95 %; RS $\geq$ 0,05		
			RA	RS	% mut
DTC CS1	DTC: I836	I836 en DTC: delección	0,144	0,07	12,6
DTC CS2	DTC D835	D835 en DTC: sustitución	0,089	0,05	8,2
DIT CS1	DIT: 24 pb	Inserto en DIT pequeño: < 30 pb	0,107	0,05	9,7
DIT CS2	DIT: 66 pb	Inserto en DIT medio: 30-100 pb	0,189	0,08	15,9
DIT CS3	DIT: 217 pb	Inserto en DIT grande: ~200 pb	0,539	0,08	35,0

16.4. Precisión

La precisión de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se determinó mediante el análisis independiente, por parte de tres operarios, de 10 réplicas de muestras con mutación por DIT con insertos de entre 30 pb y 126 pb y muestras con mutación en DTC. Las 10 réplicas se analizaron en lotes de dos en cinco ocasiones.

- 16.4.1. Para las muestras de mutación por DIT, los intervalos del %CV de la RS para los 3 operarios fueron 7,4-15,0 %, 3,7-13,0 % y 4,2-8,8 %.
- 16.4.2. Para las muestras de mutación en DTC, los intervalos del %CV de la RS para los 3 operarios fueron 6,3-11,2 %, 5,8-9,3 % y 5,5-8,3 %.

16.5. Reproducibilidad entre operarios (estirpes celulares)

Las muestras procedían de estirpes celulares con mutaciones por DIT con insertos de 30 pb y 126 pb y mutaciones D835 en DTC. Las muestras representaron una RS mutada-sin mutar baja (cercana al valor de corte), media y alta (estirpe celular mutada al 100 %) para insertos pequeños de duplicación interna en tándem (DIT), insertos grandes por DIT y mutaciones en el dominio tirosina cinasa (DTC). Los tres operarios usaron un mismo lote de reactivo y un mismo instrumento en 15 desarrollos en los que analizaron 10 réplicas; el %CV de la RS osciló entre el 6,6 % y el 13,3 %.

- 16.5.1. Para las muestras de la mutación en DTC, el %CV de la RS varió entre el 7,9 % y el 9,3 %.
- 16.5.2. Para las muestras de la mutación por DIT con insertos de hasta 30 pb, el %CV de la RS varió entre el 6,6 % y el 16,1 %.
- 16.5.3. Para las muestras de la mutación de DIT con insertos de hasta 126 pb, el %CV de la RS varió entre el 9,0 % y el 13,3 %.

16.6. Reproducibilidad entre operarios (muestras clínicas)

En un segundo estudio, se evaluó la precisión en muestras clínicas de ADN con 8 muestras clínicas (4 de SP y 4 de MO) de mutaciones por DIT de 21 pb, 24 pb, 66 pb, 90 pb y 217 pb, sustitución de DTC en D835, delección de DTC en I836 y de muestras negativas para *FLT3*. El ADN de las muestras clínicas negativas para *FLT3* se combinó y se usó para diluir las muestras positivas para *FLT3* con el fin de alcanzar tres niveles objetivo de RS cercana al valor de corte clínico de la prueba (es decir, alto negativo [AN], bajo positivo [BP] y moderado positivo [MP]). Esto dio lugar a cinco muestras clínicas positivas para *FLT3* de SP y a dos de MO. Tres operarios analizaron tres réplicas de cinco muestras positivas para DIT, dos muestras positivas para DTC y una mezcla de muestras negativas. Para ello, usaron un lote de reactivos durante cinco días no consecutivos, tres niveles de dilución en las muestras positivas y cero diluciones en las muestras negativas. Cada operario analizó un total de 15 réplicas por nivel y de 45 réplicas por nivel de dilución.

La siguiente tabla recoge el %CV para todos los tipos y niveles de mutación; el %CV para todos los tipos de mutación, excepto para la muestra de DIT con un inserto de gran tamaño (217 pb), fue de entre el 4,2 % y el 16,1 %. El %CV de la muestra de mutación con un inserto de 217 pb fue de entre el 26,9 % y el 27,2 % (Tabla 23). El %CV del nivel de dilución bajo positivo (BP) fue del 26,9 % (217 pb), por lo que no se ajustó al criterio de aceptación del estudio: ≤ 25 % de CV para la RS. Los resultados indican que se cumplieron los criterios de aceptación para las mutaciones D835 e I836 en DTC y las mutaciones por DIT de hasta 217 pb. La variación para la mutación por DIT de 217 pb superó el 25 %, lo que indica una mayor imprecisión en torno a las mutaciones por DIT de mayor tamaño.

Tabla 23: Componentes de la varianza por tipo de mutación y nivel de dilución

Id. de la muestra	Tipo de mutación	Nivel de la dilución	RS media	Variación de la RS por			Variación total	
				DE: operario/instrumento (%)	DE: día del desarrollo (%)	DE: error aleatorio (%)	DE	%CV
S1	DTC: I836	AN	0,03	0,000 (3,22 %)	0,000 (0,00 %)	0,002 (96,78 %)	0,002	7,1
		BP	0,077	0,001 (2,60 %)	0,000 (0,00 %)	0,005 (97,40 %)	0,005	5,9
		MP	0,132	0,002 (6,67 %)	0,003 (17,43 %)	0,005 (75,90 %)	0,006	4,6
S2	DTC: D835	AN	0,04	0,001 (7,13 %)	0,000 (0,00 %)	0,002 (92,87 %)	0,002	5,3
		BP	0,08	0,002 (14,02 %)	0,001 (2,47 %)	0,004 (83,51 %)	0,004	5,3
		MP	0,165	0,003 (16,28 %)	0,000 (0,00 %)	0,007 (83,72 %)	0,007	4,2
S3	DIT: 21 pb	AN	0,03	0,000 (0,00 %)	0,000 (0,00 %)	0,001 (100,0 %)	0,001	5
		BP	0,074	0,000 (0,00 %)	0,002 (8,08 %)	0,005 (91,92 %)	0,005	7,2
		MP	0,133	0,002 (14,46 %)	0,000 (0,00 %)	0,005 (85,54 %)	0,006	4,4
S4	DIT: 24 pb	AN	0,029	0,000 (0,00 %)	0,000 (0,00 %)	0,004 (100,0 %)	0,004	15,2
		BP	0,07	0,000 (0,00 %)	0,000 (0,92 %)	0,004 (99,08 %)	0,004	5,3
		MP	0,147	0,002 (8,20 %)	0,001 (3,28 %)	0,006 (88,52 %)	0,007	4,5
S5	DIT: 66 pb	AN	0,029	0,001 (4,28 %)	0,000 (0,00 %)	0,005 (95,72 %)	0,005	16,1
		BP	0,083	0,000 (0,00 %)	0,001 (1,13 %)	0,007 (98,87 %)	0,007	8
		MP	0,185	0,000 (0,00 %)	0,000 (0,00 %)	0,010 (100,0 %)	0,01	5,3
S6	DIT: 90 pb	AN	0,03	0,001 (5,15 %)	0,000 (0,00 %)	0,003 (94,85 %)	0,003	10,1
		BP	0,091	0,004 (25,23 %)	0,002 (8,42 %)	0,007 (66,35 %)	0,008	8,5
		MP	0,206	0,013 (44,26 %)	0,005 (7,34 %)	0,013 (48,40 %)	0,019	8,5
S7	DIT: 217 pb	AN	0,032	0,001 (0,90 %)	0,002 (7,20 %)	0,008 (91,90 %)	0,009	27,2
		BP	0,079	0,013 (31,42 %)	0,009 (14,86 %)	0,017 (53,71 %)	0,023	26,9
		MP	0,162	0,029 (36,75 %)	0,015 (9,86 %)	0,035 (53,39 %)	0,047	27,2

16.7. Reproducibilidad entre lotes y entre instrumentos

La reproducibilidad entre lotes y entre instrumentos la determinó un solo operario, que analizó un conjunto de muestras con tres lotes de reactivos y tres conjuntos de instrumentos. Las muestras de estirpes celulares contenían mutaciones por DIT e insertos de entre 30 pb y 126 pb y mutaciones en DTC.

16.7.1. Para las muestras de mutación por DIT, el %CV de la RS varió entre el 3,0 % y el 8,4 %.

16.7.2. Para las muestras de mutación en DTC, el %CV de la RS varió entre el 5,4 % y el 10,6 %.

16.8. Sustancias interferentes: exógenas

La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay detecta mutaciones por DIT de entre 15 pb y 114 pb y mutaciones en DTC en presencia de heparina sódica o EDTA y la solución amortiguadora de lavado utilizada durante el proceso de aislamiento del ADN.

16.9. Sustancias interferentes: endógenas

La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay detecta mutaciones por DIT de entre 18 pb y 114 pb y mutaciones en DTC en presencia de lípidos/triglicéridos, hemoglobina, proteína y bilirrubina.

16.10. Sustancias interferentes: fármacos

La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay detecta mutaciones por DIT de entre 18 pb y 114 pb y mutaciones en DTC en presencia de daunorubicina.

16.11. Transferencia y contaminación cruzada

Cuando se pusieron a prueba mediante la configuración de mapas de placas habituales, se demostró que la transferencia y la contaminación cruzada no son problemáticas para la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay:

16.11.1. La tasa de transferencia/contaminación cruzada fue del 0 %.

16.11.2. La tasa de error del control sin molde en DIT y DTC fue del 0 %.

16.12. Aportaciones de ADN

El objetivo del estudio fue presentar datos que demostraran la equivalencia con aportaciones de ADN de 10 ± 3 ng/μl. Se usaron réplicas de ADN extraídas del estudio del límite de detección y del intervalo dinámico con muestras artificiales; se analizaron solo las muestras que presentaban una relación alélica más baja. Las muestras de ADN, que figuran a continuación, se diluyeron en 7, 10 y 13 ng/μl y se analizaron usando la prueba y una sola réplica del control negativo.

16.12.1. DIT de 30 pb con una RA de 0,03 (33 réplicas por nivel de aportación de ADN)

16.12.2. D835 (DTC) con una RA de 0,05 (33 réplicas)

16.12.3. DIT de 126 pb con una RA de 0,05 (22 réplicas)

16.12.4. DIT de 279 pb con una RA de 1 (11 réplicas)

Se reunieron los criterios de aceptación para DIT de 30 pb, DIT de 126 pb y D835 (DTC): 1. >93,9 % de las réplicas reunieron los criterios de validez para cada tipo de muestra y aportación de ADN; 2) el coeficiente de variación (CV) global fue <20,5 % para todos los tipos de muestras; y 3) el CV fue <21,0 % para todos los tipos de muestras cuando las réplicas se combinaron por aportación de ADN en 7-10 ng/μl y en 13-10 ng/μl. No se reunieron los criterios de aceptación relativos a la estirpe celular con DIT de gran tamaño. Aunque el 100 % de las réplicas reunió los criterios de validez de las muestras, el CV global y el CV entre aportaciones de ADN combinadas superaron el 25 %.

La diferencia por lo que respecta a la media de la RS mutada-sin mutar para las aportaciones de ADN no fue superior a 0,022; las diferencias entre medias no fueron especialmente distintas. La prueba arroja resultados coherentes cuando se utilizan aportaciones de ADN de 10 ± 3 ng/μl.

17. Evaluación del rendimiento clínico

17.1. Perspectiva general del estudio fundamental de transferencia (IVS-002-001)

- 17.1.1. Para respaldar la evaluación de la seguridad y la eficacia de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, fue necesario demostrar la concordancia clínica entre muestras cuyo estado de *FLT3* se hubiera determinado a través del ensayo clínico (EC) A2301 y la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay en la población por intención de tratar. Este estudio fundamental de transferencia de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se corresponde con el estudio clínico de fase III CPKC412A2301 (A2301, CALBG 10603, RATIFY), que evaluó la midostaurina en pacientes con LMA de diagnóstico reciente con mutación de *FLT3*. La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se ha diseñado para ayudar a los médicos a tomar decisiones relativas a pacientes con LMA y mutación de *FLT3*.
- 17.1.2. Invivoscribe ha desarrollado la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay como auxiliar de diagnóstico en la evaluación de pacientes con LMA en quienes se contempla la posibilidad de usar la midostaurina. En este estudio de transferencia, se evaluó la concordancia con el EC y la eficacia del fármaco estratificada a través de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Se realizó una evaluación adicional de la concordancia de la médula ósea y la sangre periférica y una comparación entre el EC y la CDx mediante un método independiente.

17.2. Objetivos del estudio (IVS-002-001)

- 17.2.1. Los principales objetivos del estudio fueron: 1) conocer la concordancia por lo que respecta a la selección de pacientes con una mutación de *FLT3* entre el EC A2301 y la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay evaluando el porcentaje de concordancia total, positiva y negativa entre estos dos métodos; y 2) calcular la eficacia de la midostaurina en la población positiva de acuerdo con la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, así como la supervivencia global (SG).
- 17.2.2. Los objetivos secundarios del estudio fueron: 1) identificar posibles covarianzas demográficas y patológicas que repercutan en la relación diagnóstico-eficacia; y 2) presentar datos objetivos de la concordancia del ADNg aislado de células mononucleares (CMN) aisladas de la médula ósea (MO) y de sangre periférica (SP) en los dos tipos de muestras analizados con la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay mediante la comparación de muestras pareadas.
- 17.2.3. Algunos de los análisis y pruebas adicionales fueron la evaluación de la presencia o la ausencia de mutación de *FLT3* mediante la secuenciación de nueva generación del ADN utilizando una tecnología de secuenciación del ADN de alto rendimiento como fuente independiente de información de la secuencia.

17.3. Población de pacientes (IVS-002-001)

- 17.3.1. Se evaluó a más de 3000 pacientes para examinar la posibilidad de que participaran en un ensayo clínico (el ensayo A2301) en el que se incluyó a 717 pacientes. Para realizar las pruebas, se utilizó el protocolo habitual en nueve centros distintos. Se incluyó en el ensayo A2301 a pacientes con mutaciones de *FLT3* en una muestra de MS o SP. El valor de corte clínico se estableció en 0,05 (relación de señal mutada-sin mutar).
- 17.3.2. El análisis de concordancia (AC) (N = 1100) contó con un subconjunto de pacientes que firmó un consentimiento informado para su evaluación mediante la prueba CDx. Para el análisis de concordancia entre el EC y la prueba CDx, se utilizó a la población del AC. Los resultados del análisis de la muestra de médula ósea con la prueba CDx se usaron en el análisis estadístico, como se define en el protocolo del estudio de transferencia.

17.4. Selección de pacientes y muestras para la prueba CDx de *FLT3* (IVS-002-001)

- 17.4.1. Se seleccionó a los pacientes del estudio de transferencia a través de las muestras almacenadas disponibles y con la información disponible en ese momento en el consentimiento informado. Se disponía de las muestras de 618 pacientes (EC+). Se seleccionó a un número similar de pacientes no incluidos (supuestamente EC-) y a un 15 % adicional para justificar la posibilidad de resultados positivos de mutación de *FLT3* entre los pacientes no incluidos.
- 17.4.2. El estudio de transferencia contó con 503 muestras positivas de acuerdo con el EC y 555 muestras negativas de acuerdo con el EC.
- 17.4.3. Una vez se identificaron, se seleccionó una muestra por paciente. De los pacientes con muestras de médula ósea y sangre periférica (110 pacientes incluidos y 123 pacientes no incluidos), se seleccionó una muestra de cada tipo para respaldar la comparación de tipos de muestra. Por lo que respecta a los pacientes con ambos tipos de muestra, para la concordancia EC-CDx y los análisis de eficacia clínica, se utilizó el resultado del análisis de la médula ósea.

17.5. Análisis de la seguridad (IVS-002-001)

- 17.5.1. No se espera que la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay genere efectos adversos, pero sus resultados podrían influir directamente en el riesgo terapéutico del paciente.

17.6. Eficacia (IVS-002-001)

- 17.6.1. Para los análisis de validación clínica de la prueba CDx, se utilizaron las muestras de 1058 pacientes con LMA de la población del ensayo A2301. La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay demostró concordancia con el EC, una eficacia similar al A2301 y una precisión comparable a la secuenciación de alto rendimiento (Tabla 24).

- 17.6.1.1. El análisis principal demostró lo siguiente:

- 17.6.1.1.1 La concordancia EC-CDx en cuanto al estado de *FLT3* fue elevada (> 97 %), con una concordancia porcentual positiva (CPP), una concordancia porcentual negativa (CPN) y una concordancia porcentual global (CPG) muy por encima del criterio de aceptación del 90 % para la concordancia positiva y negativa.

Tabla 24: Tabla de concordancia general entre CDx y el EC

<i>FLT3</i> : CDx	<i>FLT3</i> : EC	
	+	-
+	489	8
-	9	540
No válido	5	7
Total	503	555

- No válido indica que se analizó una muestra mediante CDx y que el resultado no fue válido.

- 17.6.1.1.2 Las concordancias (IC del 95 %) son:

- 17.6.1.1.2.1 PPA: 97,2 % (95,4 %, 98,5 %)
 17.6.1.1.2.2 NPA: 97,3 % (95,6 %, 98,5 %)
 17.6.1.1.2.3 OPA: 97,3 % (96,1 %, 98,2 %)

- 17.6.2. La concordancia EC-CDx en las pruebas específicas de DIT y DTC (CPP, CPN y CPG) fue superior al 90 % (tabla 25 y tabla 26).

Tabla 25: Tabla de concordancia entre DIT en CDx y DIT en el EC

DIT: CDx	DIT: EC	
	+	-
+	378	5
-	6	660
No válido	4	5
Total	388	670

- No válido indica que se analizó una muestra mediante CDx y que el resultado no fue válido.

Tabla 26: Tabla de concordancia entre DTC en CDx y DTC en el EC

DTC: CDx	DTC: EC	
	+	-
+	127	12
-	6	902
No válido	2	8
Total	135	922

- No válido indica que se analizó una muestra mediante CDx y que el resultado no fue válido.

- 17.6.3. En el ensayo clínico, la eficacia se estableció sobre la base de la supervivencia global (SG) en el CT entre la fecha de aleatorización y la muerte por cualquier causa. El análisis principal se realizó después de un seguimiento mínimo de aproximadamente 3,5 años tras la aleatorización del último paciente. El tratamiento con midostaurina y quimioterapia fue superior al placebo más quimioterapia en cuanto a la SG (CRI: 0,77; IC del 95 %: 0,63-0,95; *p* bilateral = 0,016) (Figura 9). Dado que las curvas de supervivencia se estabilizaron antes de alcanzar la mediana, la mediana de la supervivencia no pudo calcularse de manera fiable.

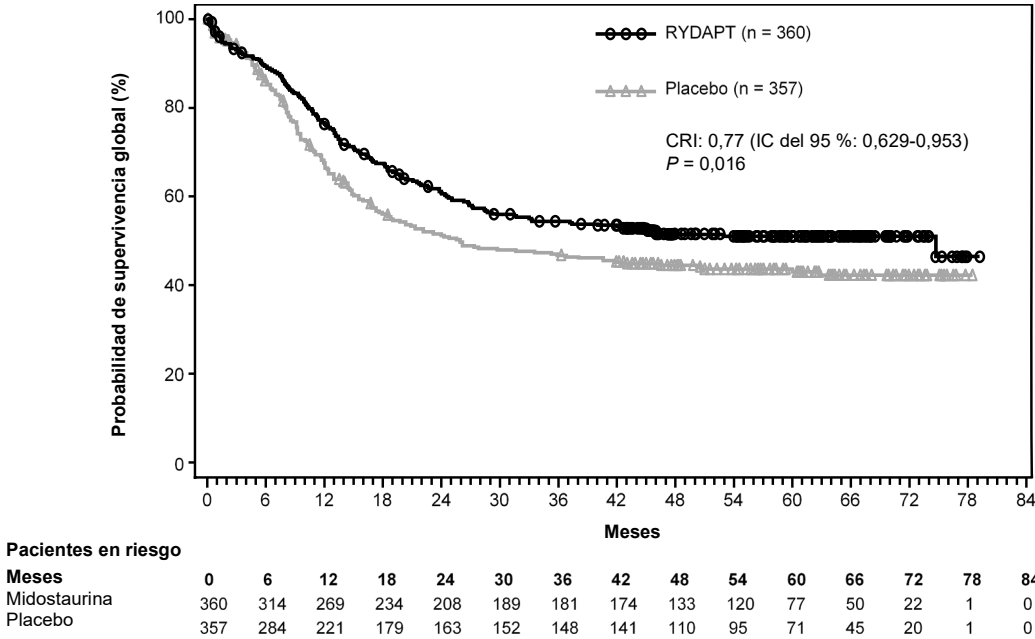


Figura 9: Curva de Kaplan-Meier sobre la supervivencia global en el ensayo A2301 en la población EC+.

17.7. Eficacia en la población (EC+, CDx+) (489 sujetos) (IVS-002-001)

17.7.1. Se calculó la eficacia de la midostaurina en la supervivencia global en la población positiva de acuerdo con la CDx. La eficacia en la población (EC+, CDx+) fue similar en el ensayo clínico A2301 y en la prueba CDx, tanto para la supervivencia global como para la ausencia de censura en el trasplante de células madre (consulte la Figura 9 y la Figura 10, respectivamente). El cociente de riesgos instantáneos (IC del 95 %) de la SG fue de 0,67 (0,52-0,87); el de A2301 fue de 0,77 (0,63-0,95).

CPKC412A2301/CALGB10603: estudio de transferencia

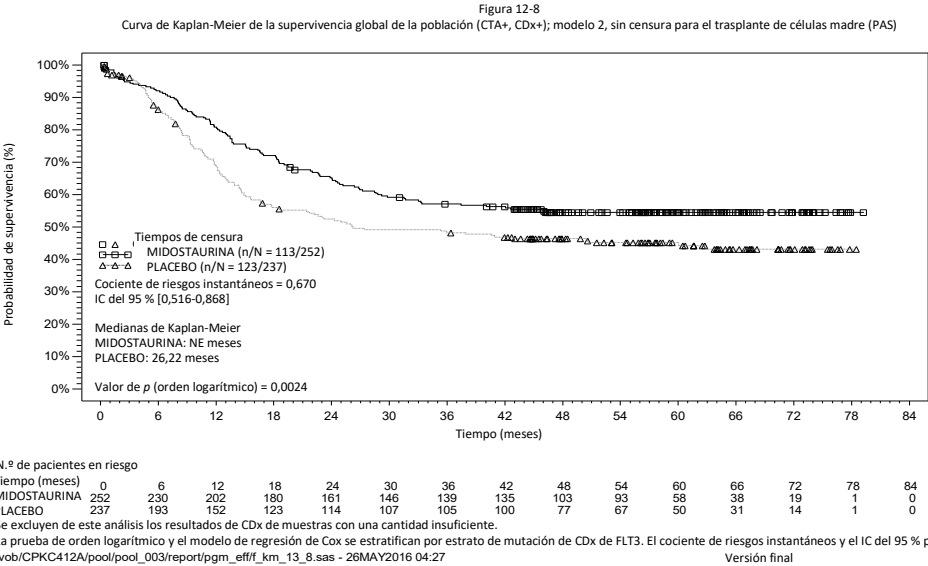


Figura 10: Curva de Kaplan-Meier sobre la supervivencia global en el ensayo A2301 en la población EC+, CDx+.

El análisis secundario y otros análisis demostraron lo siguiente:

- 17.7.1.1. Las características demográficas y pronósticas clínicamente significativas, como la citogenia de la leucemia, estuvieron bien equilibradas entre las poblaciones evaluables con CDx y las poblaciones no evaluables con CDx, así como entre los grupos de tratamiento y placebo.
- 17.7.1.2. La concordancia entre sangre periférica y médula ósea (CPP y CPN) fue superior al 95 %, lo que indica que pueden utilizarse ambos tipos de muestras para el diagnóstico (Tabla 27 y Tabla 28).

Tabla 27: Tabla de concordancia entre la sangre periférica y la médula ósea

Sangre periférica	Médula ósea	
	+	-
+	91	1
-	2	90
Total	93	91

Tabla 28: Concordancia entre la sangre periférica y la médula ósea

Medida de la concordancia	Concordancia porcentual	IC del 95 % ⁽¹⁾
CPM	98,4 %	(96,2-100,0 %)
CNM	98,4 %	(96,2-100,0 %)

⁽¹⁾ El IC del 95 % se calculó utilizando un método de muestreo con reposición no paramétrico

17.8. Conclusiones (IVS-002-001)

- 17.8.1. Por lo general, los resultados indican que la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay es capaz de identificar mutaciones por DIT y en DTC de *FLT3* en la población de pacientes con LMA que se incluyó en el ensayo clínico A2301.
- 17.8.2. Los resultados del estudio respaldan la seguridad y la eficacia de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay cuando se usa de acuerdo con las indicaciones de uso.

17.9. Perspectiva general del estudio (IVS-056-001)

- 17.9.1. Invivoscribe (IVS) ha desarrollado la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, que cuenta con la aprobación de la FDA como auxiliar de diagnóstico para la evaluación de la leucemia mielógena aguda (LMA). Para demostrar la utilidad clínica de este auxiliar de diagnóstico (CDx), los pacientes firmaron un consentimiento informado por el que se analizaron sus muestras con la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay antes de la inclusión en un estudio clínico fundamental (estudio 2215-CL-0301 de fase III para la evaluación de la eficacia de ASP2215). Los dos tipos de mutaciones del gen *FLT3* que detecta la prueba de mutación de *FLT3* CDx son la mutación por duplicación interna en tándem (DIT) y en el dominio tirosina cinasa (DTC).
- 17.9.2. Para evaluar la precisión de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, se utilizó un método de secuenciación de nueva generación con una plataforma MiSeq de Illumina como fuente independiente de información de la secuenciación para las mutaciones por DIT o en DTC. Invivoscribe ha desarrollado y validado las pruebas de referencia necesarias para evaluar la presencia o la ausencia de mutaciones de *FLT3* por DIT o en DTC. A continuación, se utilizó esta prueba para evaluar la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay con ADN extraído de muestras biológicas recogidas durante la selección e inclusión en el estudio 2215-CL-0301.

17.10. Objetivos del estudio (IVS-056-001)

- 17.10.1. El objetivo coprincipal del estudio fue calcular la eficacia del gilteritinib fumarato en la población positiva de acuerdo con la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay aplicando una prueba de orden logarítmico estratificada a la supervivencia global.
- 17.10.2. El objetivo del estudio del método de referencia es evaluar de forma independiente la presencia o ausencia de mutaciones de *FLT3* utilizando la plataforma de secuenciación de nueva generación MiSeq de Illumina para confirmar la precisión de la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. El objetivo del estudio se describe en el apartado Objetivo secundario del protocolo del estudio fundamental de la prueba de mutación de *FLT3* LeukoStrat CDx para ASP2215.

17.11. Población de pacientes (IVS-056-001)

- 17.11.1. Se analizaron 771 muestras de 633 sujetos con la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. La población por intención de tratar (ITT) final estuvo compuesta por 371 sujetos. Se excluyó del conjunto de análisis completo (CAC) a cinco sujetos que dieron negativo de acuerdo con la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay y que se incluyeron vistos los resultados de las pruebas de *FLT3* locales. Por lo tanto, el CAC del análisis final estuvo compuesto por los 366 sujetos aleatorizados en el estudio.

17.12. Selección de muestras para las pruebas del método de referencia (IVS-056-001)

- 17.12.1. Se seleccionó una muestra por sujeto para las pruebas del método de referencia. Se excluyeron las muestras con un volumen insuficiente para la realización de pruebas del método de referencia. Se analizaron 467 muestras con el método de referencia.

17.13. Análisis de la seguridad (IVS-056-001)

17.13.1. No se espera que la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay genere efectos adversos, pero sus resultados podrían influir directamente en el riesgo terapéutico del paciente.

17.14. Eficacia (IVS-056-001)

17.14.1. En el análisis final, la mediana de la SG del grupo que usó el gilteritinib fumarato fue mayor (9,3 meses) que la del grupo que se sometió a quimioterapia antineoplásica de último recurso (5,6 meses) en la población CDx+. Se calculó que el cociente de riesgos instantáneos (CRI) estratificado por regresión de Cox fue de 0,637 (IC del 95 %: 0,488-0,830) para la quimioterapia antineoplásica de último recurso; valor de *p* (orden logarítmico estratificado unilateral) = 0,0004, lo que corresponde a una reducción del riesgo relativo de muerte a favor del gilteritinib fumarato. En la Figura 11 se recoge una curva de Kaplan-Meier al respecto.

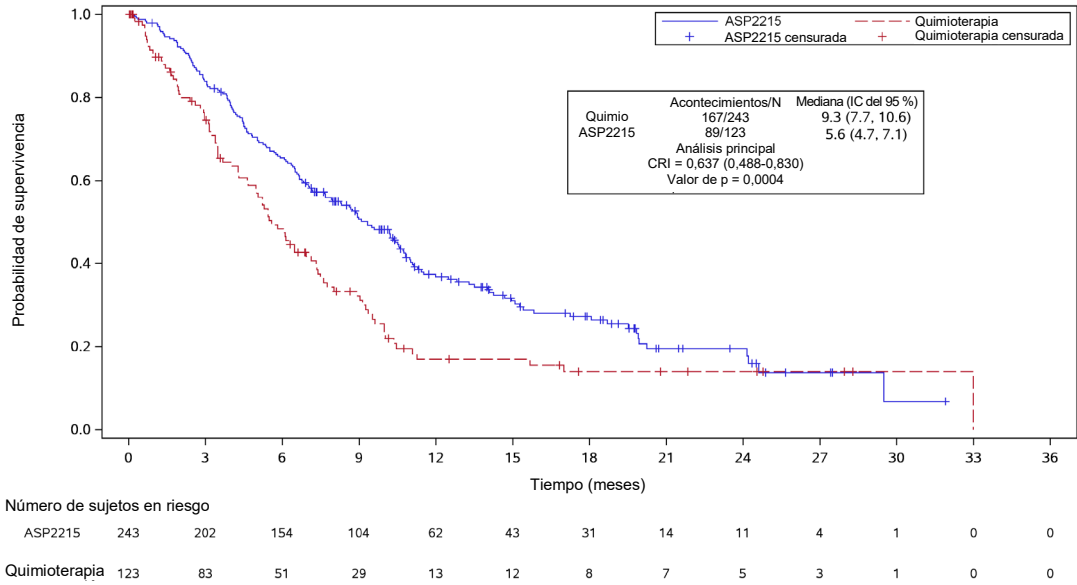


Figura 11: Curva de Kaplan-Meier sobre la supervivencia global

17.14.2. La LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay demostró su concordancia con el método de referencia. La concordancia global fue elevada (97,2 %). El límite inferior del intervalo de confianza del 95 % de la CPG está por encima del 90 %, lo que demuestra la concordancia para la mutación *FLT3* entre la prueba CDx y la secuenciación con MiSeq.

Tabla 29: Concordancia entre CDx y la secuenciación con MiSeq

Concordancia	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95 % ⁽¹⁾
PPA	100 % (300/300)	(98,8-100 %)
NPA	92,0 % (150/163)	(86,7-95,7 %)
OPA	97,2 % (450/463)	(95,2-98,5 %)

⁽¹⁾El IC del 95 % se calcula utilizando el método exacto de Clopper-Pearson.

Los cálculos de CPP, CPN y CPG para DIT son del 100 %, el 92,8 % y el 97 %, respectivamente. Los cálculos de CPP, CPN y CPG para DTC son del 100 %, el 99,3 % y el 99,4 %, respectivamente.

Tabla 30: Tabla de contingencia entre DIT en CDx y la secuenciación con MiSeq

CDx	MiSeq		Total
	MiSeq+	MiSeq-	
CDx+	270	14	284
CDx-	0	180	180
Total	270	194	464

Tabla 31: Tabla de contingencia entre DTC en CDx y la secuenciación con MiSeq

CDx	MiSeq		Total
	MiSeq+	MiSeq-	
CDx+	32	3	35
CDx-	0	431	431
Total	32	434	466

17.15. Conclusiones (IVS-056-001)

- 17.15.1. Se incluyó a 366 sujetos en el conjunto de análisis completo. La mediana de la SG del grupo que usó el gilteritinib fumarato fue mayor (9,3 meses) que la del grupo que se sometió a quimioterapia antineoplásica de último recurso (5,6 meses) en la población CDx+. Se calculó que el cociente de riesgos instantáneos (CRI) estratificado por regresión de Cox fue de 0,637 (IC del 95 %: 0,488-0,830) para la quimioterapia antineoplásica de último recurso; valor de p (orden logarítmico estratificado unilateral) = 0,0004, lo que corresponde a una reducción del riesgo relativo de muerte a favor del gilteritinib fumarato.
- 17.15.2. Se alcanzó el criterio de aceptación de la prueba del método de referencia: el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % para la concordancia porcentual general (CPG) (Clopper-Pearson) superó el 90 %. Se estableció la concordancia entre la LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay y el método de referencia, que es la secuenciación de nueva generación con MiSeq.

18. Bibliografía

- Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Gieger T, Copper LC, Smith BD, Small D and Berg KD. Detection of *FLT3* Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Change Reaction and Capillary Electrophoresis Assay. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2003, 5:96-102.
- Yamamoto, Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodaera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. *Blood*, 2001, 97(8):2434-9.

19. Servicio técnico y atención al cliente

Datos de Contacto



Invivoscribe, Inc

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

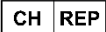
Teléfono: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horario comercial: De 07:00 a 17:00 PST/PDT

Servicio técnico: support@invivoscribe.com | Atención al cliente: sales@invivoscribe.com | Sitio web: www.invivoscribe.com

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

20. 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

21. Aviso legal

Aviso de patente pendiente.

Este es un producto de diagnóstico *in vitro*. No disponible para su venta o uso en Norteamérica.

El uso de este producto puede implicar el uso de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La adquisición de las licencias necesarias para usar los métodos de amplificación, las enzimas de amplificación o los equipos cubiertos por patentes de terceros es responsabilidad del usuario. Invivoscribe, Inc. no otorga dicha licencia de forma explícita ni implícita.

LeukoStrat® es una marca comercial registrada de Invivoscribe, Inc.

RYDAPT® es una marca comercial registrada de Novartis AG.

LIZ®, Life Technologies®, GeneMapper®, GeneScan™, POP-7™, Veriti™, Hi-Di™, LIZ™ y NanoDrop™ son marcas comerciales registradas de Thermo Fisher Scientific.

eLINE® es una marca comercial registrada de Sartorius.

QIAamp® y QIAcube® son marcas comerciales registradas de Qiagen.

©2024 Invivoscribe, Inc. Todos los derechos reservados. Las marcas comerciales que figuran en este documento son propiedad de Invivoscribe, Inc., de sus filiales o, en el caso de las marcas comerciales de terceros, de sus respectivos dueños.