

Istruzioni per l'uso

CE 2797 IVD

LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay

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

IVD Per uso diagnostico *in vitro*



 **invivoscribe®**

N. di catalogo

REF K4120431

Prodotto

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

Quantità

33 reazioni

Indice

1.	NOME COMMERCIALE	4
2.	DESTINAZIONE D'USO.....	4
3.	INDICAZIONI/CONTROINDICAZIONI	4
4.	GLOSSARIO	4
5.	SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST.....	4
6.	PRINCIPI DELLA PROCEDURA	5
	6.1. Mutazioni per duplicazione tandem interna (ITD) di <i>FLT3</i>	5
	6.2. Mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD) di <i>FLT3</i>	6
	6.3. Utenti finali e ambiente d'uso.....	6
7.	REAGENTI E MATERIALI	7
8.	STRUMENTI/ACCESSORI.....	11
	8.1. Software (fornito).....	11
9.	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	12
	9.1. Precauzioni di sicurezza informatica	13
10.	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	14
	10.1. Precauzioni	14
	10.2. Sostanze interferenti con la PCR	14
	10.3. Requisiti e manipolazione dei campioni.....	14
11.	PROCEDURA DEL SAGGIO.....	14
	11.1. Ispezione dei campioni	14
	11.2. Preparazione della processazione dei campioni	14
	11.3. Diluizione dei campioni clinici	14
	11.4. Isolamento delle cellule mononucleate (MNC)	14
	11.5. Conta delle cellule mononucleate	15
	11.6. Preparazione dei campioni per l'estrazione del DNA e completamento dell'isolamento	15
	11.7. Preparazione della stazione di automazione QIAcube	16
	11.8. Estrazione del DNA	16
	11.9. Quantificazione e diluizione del DNA.....	16
	11.10. Amplificazione.....	17
	11.11. Digestione con enzimi di restrizione (solo mutazione TKD).....	18
	11.12. Rilevamento con elettroforesi capillare.....	19
	11.13. Preparazione della soluzione di standard di riferimento, se necessario.....	19
	11.14. Preparazione della piastra dei campioni.....	20
	11.15. Impostazione di PlateMapper con il software LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software.....	21
	11.16. Configurazione del software dello strumento 3500xL o 3500xL Dx.....	29
	11.17. Esecuzione della corsa con l'analizzatore genetico 3500xL o 3500xL Dx.....	31
	11.18. Analisi dei dati con il software GeneMapper.....	31
	11.19. Analisi dei dati con il LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software.....	32
12.	CONTROLLO DI QUALITÀ	38
	12.1. Validità della corsa.....	38
	12.2. Validità del controllo di estrazione e dei campioni.....	38
13.	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.....	38
14.	RIPETIZIONE DELL'ANALISI.....	40
	14.1. Corse non valide.....	40
	14.2. Controllo di estrazione non valido nell'ambito di corse valide	40
	14.3. Campioni non validi nell'ambito di corse valide.....	40
	14.4. Dettagli di mancata riuscita e ripetizione dell'analisi	40
	14.5. Mancata riuscita di più pozzetti nell'ambito di una corsa	43
	14.6. Variazione di mobilità dovuta al colorante (dye shift).....	45
15.	LIMITI DELLA PROCEDURA	45
16.	VALORI ATTESI.....	45
	16.1. Dimensioni attese dei prodotti amplificati.....	45

17.	VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI NON CLINICHE	46
17.1.	Sensibilità analitica – Limite del bianco (LoB)	46
17.2.	Sensibilità analitica	46
17.3.	Precisione	48
17.4.	Riproducibilità inter-operatore (linee cellulari)	48
17.5.	Riproducibilità inter-operatore (campioni clinici)	48
17.6.	Riproducibilità inter-lotto e inter-strumento	49
17.7.	Sostanze interferenti - Esogene	49
17.8.	Sostanze interferenti - Endogene.....	49
17.9.	Sostanze interferenti - Trattamenti farmacologici	49
17.10.	Carry-over e contaminazione crociata	50
17.11.	Input di DNA.....	50
17.12.	Validazione delle provette di prelievo ematico con EDTA	50
17.13.	Validazione del terreno per gradiente di densità.....	50
17.14.	Validazione di NEBuffer 3.1	50
17.15.	Equivalenza: NEBuffer r3.1 vs NEBuffer 3.1.....	51
17.16.	Precisione e riproducibilità multicentrica.....	51
17.17.	Equivalenza dei campioni di sangue periferico vs aspirato midollare	52
18.	VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI CLINICHE	53
18.1.	Studio clinico IVS-056-001 (studio clinico ADMIRAL).....	53
18.2.	Studio ponte cardine IVS-062-005 (Sperimentazione clinica QuANTUM-First AC220-A-U302).....	56
19.	BIBLIOGRAFIA	58
20.	ASSISTENZA TECNICA E SERVIZIO CLIENTI	58
21.	SIMBOLI	58
22.	AVVISO LEGALE	58
23.	CRONOLOGIA DELLE REVISIONI	59

1. Nome commerciale

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

2. Destinazione d'uso

Il LeukoStrat CDx*FLT3* Mutation Assay è un test per diagnostica *in vitro* basato su PCR, progettato per il rilevamento di duplicazioni tandem interne (ITD) e delle mutazioni D835 e I836 del dominio tirosin-chinasico (TKD) nel gene *FLT3* in DNA genomico estratto da cellule mononucleate ottenute da sangue periferico o aspirati midollari di pazienti con diagnosi di leucemia mieloide acuta (LMA). Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay può essere utilizzato come strumento diagnostico di accompagnamento per le seguenti terapie:

Nei Paesi in cui è disponibile XOSPATA® (gilteritinib fumarato), il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è utilizzato come ausilio per la valutazione di pazienti affetti da LMA per i quali viene preso in considerazione il trattamento con XOSPATA (gilteritinib fumarato).

Nei Paesi in cui è disponibile VANFLYTA® (quizartinib cloridrato), il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è utilizzato come ausilio per la valutazione di pazienti affetti da *FLT3*-ITD+ LMA per i quali viene preso in considerazione il trattamento con VANFLYTA® (quizartinib cloridrato).

Il test qualitativo non automatizzato è destinato all'uso con gli analizzatori genetici 3500xL o 3500xL Dx.

3. Indicazioni/Controindicazioni

Non sono state identificate controindicazioni.

4. Glossario

LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software	Software per l'analisi dei dati ottenuti con il LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Mutation Assay.
Mutazione per duplicazione tandem interna (ITD)	Duplicazione e inserzione di una porzione del gene <i>FLT3</i> che comprende la regione situata all'interno e intorno alla regione juxtamembrana del gene <i>FLT3</i> stesso.
EC	Controllo di estrazione
NTC	Controllo senza template
PC	Controllo positivo
Rapporto di segnale (SR)	Calcolato dividendo l'area del picco mutante per l'area del picco wild-type.
Mutazione del dominio tirosin-chinasico (TKD)	Alterazione o alterazioni nucleotidiche che determinano modifiche nel codone 835 e/o 836, che vengono rilevate tramite l'inattivazione del sito di digestione di restrizione EcoRV situato all'interno del dominio tirosin-chinasico del gene <i>FLT3</i> .

5. Sommario e spiegazione del test

La leucemia mieloide acuta (LMA) solitamente ha una prognosi sfavorevole. Numerosi studi sulla LMA hanno mostrato che la presenza di mutazioni in grado di attivare *FLT3* è predittiva di una prognosi sfavorevole, il che lo rende un bersaglio terapeutico interessante.^{1,2} Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay ha come bersaglio regioni del gene *FLT3* per identificare mutazioni per duplicazione tandem interna (ITD) e mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD), come le mutazioni D835 e I836.

Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay comprende reagenti e software specifico del saggio mirati a determinare la presenza di mutazioni a carico di *FLT3* nel DNA estratto da cellule mononucleate isolate da campioni di sangue periferico o aspirato midollare dei pazienti. Il DNA viene amplificato tramite PCR, l'amplicone TKD viene digerito con metodo enzimatico e rilevato mediante elettroforesi capillare sull'analizzatore genetico 3500xL o 3500xL Dx. Lo stato mutazionale di *FLT3* viene determinato dal software LeukoStrat CDx *FLT3* Software.

Una mutazione ITD e/o TKD di *FLT3* viene riportata come positiva se il rapporto di segnale mutante:wild-type risulta uguale o superiore al valore soglia di 0,05 (consultare la sezione 13: *Interpretazione dei risultati*). La Figura 1 mostra una rappresentazione del flusso di lavoro.

6. Principi della procedura

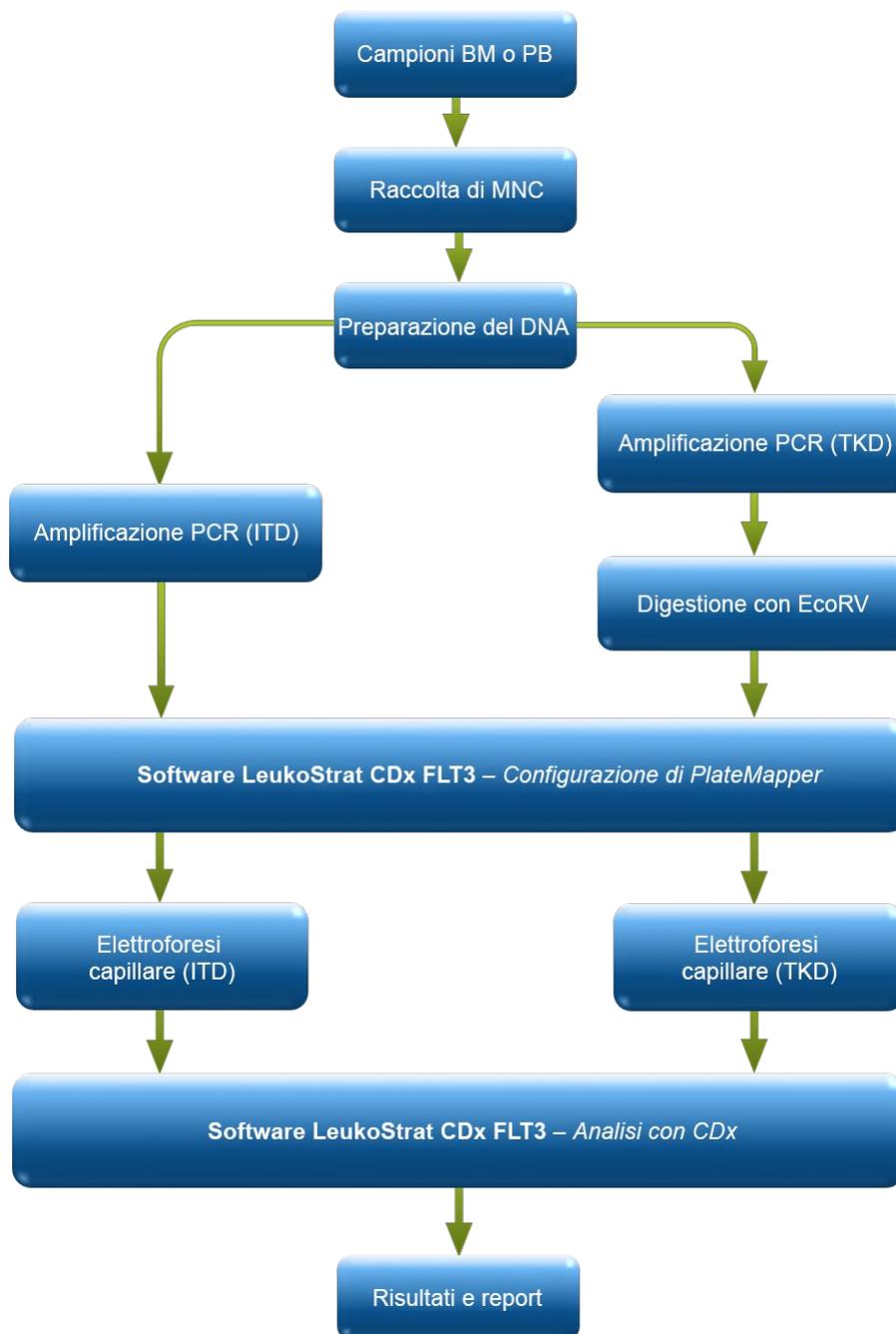


Figura 1: Riepilogo del flusso di lavoro

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

Le mutazioni ITD o di lunghezza di *FLT3* sono dovute alla duplicazione e inserzione di una porzione del gene *FLT3* che comprende la regione situata all'interno e intorno alla regione juxtamembrana (JM) del gene *FLT3* stesso. Tali mutazioni variano in relazione sia alla posizione sia alla lunghezza della sequenza di DNA duplicato inserita. Le mutazioni ITD determinano l'autofosforilazione e attivazione costitutiva di *FLT3*.¹

Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay utilizza primer situati all'interno e intorno alla regione JM. I primer di PCR diretti e inversi sono marcati in fluorescenza con fluorofori diversi che permettono di confermare la presenza del segnale del campione. Gli alleli wild-type di *FLT3* si amplificano e generano una dimensione del prodotto che, in base al presente saggio, misura 327 ± 1 bp, mentre gli alleli contenenti mutazioni ITD generano un prodotto che supera le 327 ± 1 bp (Figura 2).

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

Le mutazioni TKD di *FLT3* sono causate da sostituzioni e/o delezioni di acidi nucleici che producono una modifica della sequenza amminoacidica in questo centro catalitico altamente conservato. Le mutazioni TKD, come sostituzioni e delezioni di D835 e I836, determinano l'autofosforilazione e attivazione costitutiva di *FLT3*.²

Gli alleli wild-type del gene *FLT3* comprendono un sito di digestione di restrizione EcoRV. Quando si verifica la sostituzione di un acido nucleico, il sito di riconoscimento della digestione di restrizione scompare e l'endonucleasi EcoRV non è in grado di identificare e digerire il DNA in corrispondenza di questo sito. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay utilizza primer situati su entrambi i lati della regione TKD. La regione bersaglio di *FLT3* viene amplificata mediante PCR, dopodiché viene effettuata una digestione di restrizione EcoRV. Uno dei primer di PCR è marcato con un fluoroforo mentre l'altro contiene un sito di restrizione EcoRV ingegnerizzato, per cui vengono digeriti sia gli alleli wild-type sia quelli mutanti. Lo schema di digestione permette di identificare la perdita della sequenza genica normale e garantisce l'avvenuta digestione. Gli alleli wild-type del gene *FLT3* danno origine a prodotti di digestione di 79 ± 1 bp, mentre gli alleli mutanti generano prodotti di 125 ± 1 bp o 127 ± 1 bp a partire dall'amplicone originale non digerito di 145 ± 1 bp o 147 ± 1 bp, così come misurato dal presente saggio (Figura 2).

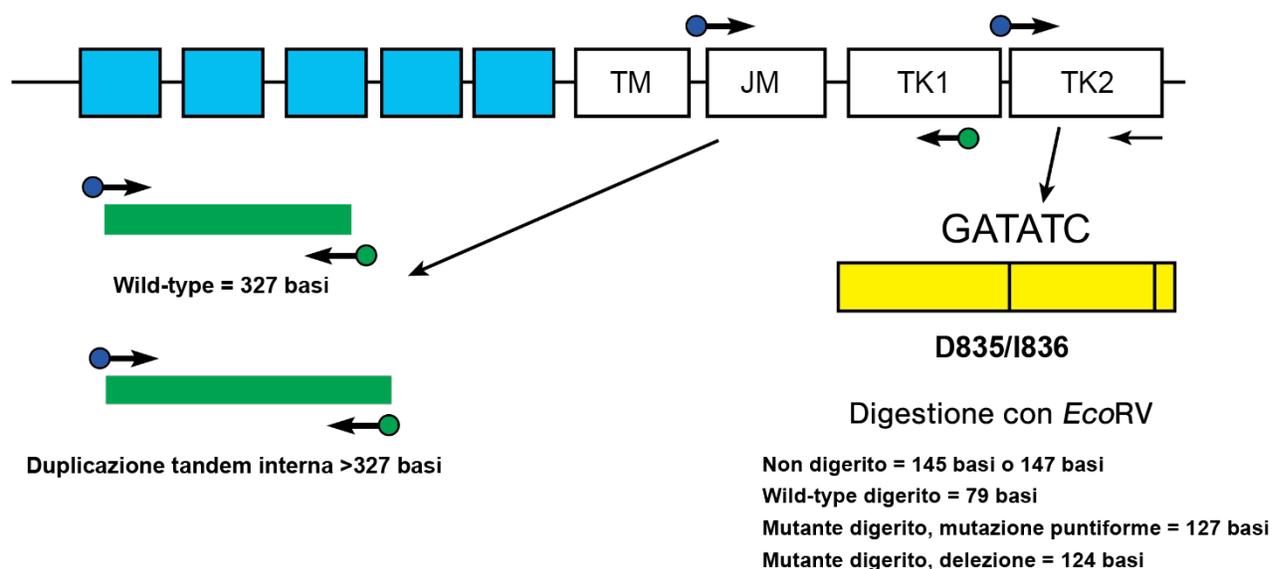


Figura 2: Rappresentazione della regione juxtamembrana (JM) di *FLT3* (TM = transmembrana) e del loop di attivazione del dominio tirosin-chinasico (TK). Le frecce nere rappresentano le posizioni relative dei primer che hanno come bersaglio l'area all'interno e intorno alla regione JM per il saggio ITD o il loop di attivazione del dominio chinasico per il saggio TKD. I puntini colorati rappresentano i fluorofori sui primer marcati. Il rettangolo giallo presenta linee nere verticali che rappresentano la posizione dei siti di digestione di restrizione EcoRV.

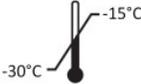
6.3. Utenti finali e ambiente d'uso

Il dispositivo è riservato all'uso professionale in un laboratorio clinico. Questo prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale addestrato nelle tecniche di PCR e nell'uso del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

7. Reagenti e materiali

NOTA: il kit del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay può essere utilizzato fino alla data di scadenza del kit riportata sull'etichetta, quando conservato come descritto nella Tabella 1.

Tabella 1: Elenco dei reagenti del kit del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, **REF** K4120431

Numero di catalogo	Nome del reagente	Etichetta del reagente	Temperatura di conservazione	Quantità unitaria	N. di unità/kit
REF R0880280 **	<i>FLT3</i> Extraction Control	<i>FLT3</i> CONTROL EC		1800 µl/flaconcino	1 flaconcino
REF B4120151 *	<i>FLT3</i> ITD Master Mix	<i>FLT3</i> ITD MM		1500 µl/flaconcino	1 flaconcino
REF B4120161 *	<i>FLT3</i> TKD Master Mix	<i>FLT3</i> TKD MM		1500 µl/flaconcino	1 flaconcino
REF R0880260 **	<i>FLT3</i> ITD Positive Control	<i>FLT3</i> ITD CONTROL +		100 µl/flaconcino	1 flaconcino
REF R0880270 **	<i>FLT3</i> TKD Positive Control	<i>FLT3</i> TKD CONTROL +		100 µl/flaconcino	1 flaconcino
REF R0930080 **	<i>FLT3</i> No Template Control	<i>FLT3</i> CONTROL NTC		200 µl/flaconcino	1 flaconcino
REF 261942	DNA polimerasi Taq	TAQ		200 µl/flaconcino	1 flaconcino
REF 261944	Enzima EcoRV	EcoRV		200 µl/flaconcino	1 flaconcino
REF 261987*	NEBuffer r3.1	NEBr3.1		1250 µl/flaconcino	1 flaconcino

*Una volta aperti, i flaconcini delle master mix e di NEBuffer r3.1 conservati congelati possono essere sottoposti a un massimo di 4 cicli di congelamento e scongelamento.

**Una volta aperti, i flaconcini dei controlli conservati congelati possono essere sottoposti a un massimo di 8 cicli di congelamento e scongelamento.

Tabella 2: Ulteriori reagenti, materiali e apparecchiature necessari (non forniti)

Piattaforma di capillari	Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali e produttori	N. di catalogo	Note
Analizzatore genetico serie 3500xL	Formammide Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: • Formammide Hi-Di™ (5 ml)	4401457 (1x5 ml) 4440753 (4x5 ml)	N/A
	LIZ Size Standard	Thermo Fisher Scientific: • GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0	4408399	N/A
	Polimero	Thermo Fisher Scientific: • Polimero POP-7™ per analizzatori genetici 3500/3500xL	4393708	N/A
	Tampone	Thermo Fisher Scientific: • Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	4393927	N/A
		Thermo Fisher Scientific: • Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series	4408256	N/A
Strumento e software per elettroforesi capillare	Thermo Fisher Scientific: • Analizzatore genetico 3500xL con software di raccolta dati (DCS) v3.3	4405633	Questo strumento non è provvisto di marchio CE.	

Tabella 2: Ulteriori reagenti, materiali e apparecchiature necessari (non forniti)

Piattaforma di capillari	Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali e produttori	N. di catalogo	Note
Analizzatore genetico serie 3500xL		Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Software GeneMapper™ v6.0, installazione completa con patch "B02" Nome ufficiale della patch "B02": GM_PeakHeight_202110 patch for GeneMapper™Software Full v6.0 	A38888	Questo software non è provvisto di marchio CE. N. di catalogo è per Windows 10. Richiesta patch di Thermo Fisher Scientific.
	Array di capillari	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Array di 24 capillari per analizzatore genetico 3500xL, 50 cm 	4404689	N/A
	Setti	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Septa Cathode Buffer Container (per analizzatori genetici serie 3500) 	4410715	N/A
		Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Septa per analizzatori genetici 3500/3500xL, 96 pozzetti 	4412614	N/A
	Retainer & Base Set	Thermo Fisher Scientific: Retainer & Base Set (standard) per analizzatori genetici 3500/3500xL, 96 pozzetti	4410228	N/A
	Set di coloranti per calibrazione spettrale	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Matrix Standard Kit (Dye Set G5) DS-33 	4345833	N/A
Analizzatore genetico serie 3500xL Dx	Formammide Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Formammide Hi-Di™ per analizzatori genetici 3500 Dx/3500xL Dx (CE-IVD) 	4440752 (4x5 ml) 4404307 (1x5 ml)	N/A
	LIZ Size Standard	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 	A25794	N/A
	Polimero	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Polimero POP-7™ per analizzatori genetici 3500 Dx/3500xL Dx 	4393709	N/A
	Tampone	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Anode Buffer Container per analizzatori genetici 3500 Dx/3500xL Dx 	4393925	N/A
		Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Cathode Buffer Container per analizzatori genetici 3500 Dx/3500xL Dx 	4408258	N/A
	Strumento e software per elettroforesi capillare	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Analizzatore genetico 3500xL Dx Applied Biosystems (24 capillari) con DCS 3.0 	A27856	N/A
		Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Software GeneMapper™ v6.0, installazione completa con patch "B02" Nome ufficiale della patch "B02": GM_PeakHeight_202110 patch for GeneMapper™Software Full v6.0 	A38888	Questo software non è provvisto di marchio CE. N. di catalogo è per Windows 10. Richiesta patch di Thermo Fisher Scientific.
	Array di capillari	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Array di 24 capillari per analizzatore genetico 3500xL Dx, 50 cm 	4404688	N/A

Tabella 2: Ulteriori reagenti, materiali e apparecchiature necessari (non forniti)

Piattaforma di capillari	Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali e produttori	N. di catalogo	Note
	Setti	Thermo Fisher Scientific: • Septa Cathode Buffer Container per analizzatori genetici 3500 Dx/3500xL Dx	4410716	N/A
		Thermo Fisher Scientific: • Septa per analizzatori genetici 3500 Dx/3500xL Dx, 96 pozzetti	4410700	N/A
	Retainer & Base Set per 3500xL Dx	Thermo Fisher Scientific: • Retainer & Base Set (standard) per analizzatori genetici 3500 Dx/3500xL Dx, 96 pozzetti	4410227	N/A
	Set di coloranti per calibrazione spettrale	Thermo Fisher Scientific: • Matrix Standard Kit (Dye Set G5) DS-33	A25775	N/A
Richiesta per entrambe le piattaforme di capillari	Pipette calibrate	<ul style="list-style-type: none"> • Monocanale 5-120 µl • 8 canali 0,2-10 µl o equivalente • Pipette P-2M, P-10N, P-20N, P100N, P-200N e P-1000N o equivalenti 	N/A	Devono essere in grado di misurare con precisione volumi compresi tra 0,5 µl e 1000 µl
	Termociclatore	Thermo Fisher Scientific: • Termociclatore Veriti™ Dx a 96 pozzetti, 0,2 ml	4452300	N/A
	Agitatore vortex	N/A	N/A	N/A
	Piastre o provette per PCR	N/A	N/A	Piastre bordate grado biologia molecolare
	Puntali per pipette con filtro	N/A	N/A	Senza RNasi/senza DNasi/apirogeni grado biologia molecolare
	Microcentrifuga	N/A	N/A	N/A
	Foglio di alluminio per piastre a 96 pozzetti	N/A	N/A	N/A
	Strip di 8 tappi per piastre a 96 pozzetti	N/A	N/A	N/A
	Acqua distillata in vetro, deionizzata per biologia molecolare o acqua purificata per uso farmaceutico	N/A	N/A	Sterili, privi di RNasi/DNasi
	Estrazione del DNA	Qiagen: • QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit	61104	Comprende tampone AL, tampone AW1, tampone AW2, tampone AE, solvente per proteasi, proteasi, provette di eluizione, provette di lisi e colonne di centrifugazione
Isolamento delle cellule mononucleate	Terreno per gradiente di densità	N/A	Densità: 1077 g/ml	

Tabella 2: Ulteriori reagenti, materiali e apparecchiature necessari (non forniti)

Piattaforma di capillari	Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali e produttori	N. di catalogo	Note
	Tampone salino	Tampone fosfato salino di Dulbecco (DPBS)	N/A	N/A
	Terreno di coltura	RPMI 1640 con L-glutamina	N/A	N/A
	Contacellule	N/A	N/A	In grado di contare le cellule nucleate
	Spettrofotometro per microvolumi a UV	Spettrofotometro a UV	N/A	In grado di misurare l'assorbanza a 260 nm per il calcolo della concentrazione degli acidi nucleici
	Alcol etilico/etanolo	N/A	N/A	96-100% etanolo
	Sistema di estrazione del DNA	QIAgen: <ul style="list-style-type: none"> • Sistema QIAcube (220-240 V) • Connettore QIAcube (220-240 V) 	9001293 9002864	N/A

Tabella 3: Materiali generici di laboratorio (non forniti)

Descrizione del materiale
Provette coniche da 15 ml
Provette coniche da 50 ml
Pipette per sierologia: 5 ml, 10 ml, 25 ml
Panni senza lanugine
Timer calibrato
Ghiaccio e secchiello per ghiaccio
Contenitore per liquidi di scarto
Provette a superficie non legante di volume appropriato per effettuare diluizioni del DNA e aliquotarlo
Provette di volume appropriato per DPBS, PCR e soluzioni master mix di digestione
Tappi a vite per provette per campioni per QIAcube
Pipette di trasferimento monouso
Puntali per pipette
Piastre bordate per elettroforesi capillare a 96 pozzetti

8. Strumenti/Accessori

NOTA: questo saggio è destinato all'uso sull'analizzatore genetico 3500xL o 3500xL Dx con il relativo software di raccolta dati installato su ciascuno strumento.

NOTA: eseguire la corretta manutenzione di tutte le apparecchiature in base alle istruzioni del produttore.

- Frigorifero in grado di mantenere una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C
- Freezer in grado di mantenere una temperatura compresa tra -30 °C e -15 °C
- Cappa per PCR
- Pipettatore
- Pipette a ripetizione
- Pipette multicanale, manuali ed elettroniche
- Centrifuga in grado di arrivare a 1000 x g con rotore oscillante e refrigerazione
- Centrifuga in grado di arrivare a 1400 x g con rotore oscillante
- La strumentazione e gli accessori indicati sopra non sono forniti

8.1. Software (fornito)

8.1.1. **REF** : K4120441 include:

- LeukoStrat CDx *FLT3* Software v1.1.x.IVD
- Cartella “3500xL Dx Files” (File 3500xL Dx) contenente:
 - *ITD CDx Assay.xml*
 - *TKD CDx Assay.xml*
- Cartella “3500xL RUO Files” (File 3500xL RUO) contenente:
 - *ITD CDx Assay.xml*
 - *TKD CDx Assay.xml*

La validazione dell'applicazione software LeukoStrat è stata eseguita con il display impostato su una risoluzione 1920 x 1200, con l'impostazione di visualizzazione “Smaller – 100%” (Inferiore - 100%). Con altre risoluzioni potrebbero verificarsi problemi di visualizzazione.

8.1.1.1. Requisiti del computer:

- Sistema operativo: Windows™ 10 Pro o Windows™ 11 Pro
- Processore: consigliata CPU Intel Core 2 Duo o più recente
- RAM: minimo 4 GB
- Spazio su disco disponibile: minimo 5 GB
- Unità CD-ROM
- Adobe Acrobat Reader 2022 o 2023

9. Avvertenze e precauzioni



- Leggere attentamente le Istruzioni per l'uso prima di iniziare la procedura di analisi e seguire attentamente ogni passaggio.
- Il saggio è validato solo per l'uso sugli analizzatori genetici 3500xL o 3500xL Dx con il relativo software di raccolta dati installato su ciascuno strumento.
- Il saggio deve essere utilizzato come un sistema. Non utilizzare reagenti di altri produttori.
- La diluizione, la riduzione dei volumi delle reazioni di amplificazione o altre deviazioni da questo protocollo possono influire sulle prestazioni di questo test e/o invalidare eventuali sublicenze limitate concesse con l'acquisto di questo kit di analisi.
- Non mescolare o combinare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi.
- I materiali sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando conservati e maneggiati come indicato. Non utilizzare i kit oltre la data di scadenza.
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i rifiuti in conformità alle normative nazionali, federali, statali e locali.
- Tenere traccia del numero di cicli di congelamento e scongelamento dei reagenti.
- Tutte le procedure di laboratorio devono essere eseguite con dispositivi di protezione individuale standard (guanti, camici da laboratorio e occhiali protettivi). Seguire le buone pratiche di laboratorio e le precauzioni universali quando si lavora con i campioni. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro del laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio. I campioni devono essere maneggiati in strutture di contenimento di biosicurezza approvate e aperti solo in cappe di biosicurezza certificate.
- A causa della sensibilità analitica di questo test, è necessario prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti o delle miscele di amplificazione con campioni, controlli o materiali amplificati. Utilizzare puntali per pipette resistenti agli aerosol e cambiare il puntale tra un campione e l'altro e tra una dispensazione di reagenti e l'altra. Monitorare attentamente tutti i reagenti per la presenza di segni di contaminazione (ad es., controlli negativi che danno segnali positivi). Smaltire i reagenti di cui si sospetta la contaminazione.
- Per ridurre al minimo la contaminazione, indossare guanti puliti quando si maneggiano campioni e reagenti e pulire regolarmente le aree di lavoro e le pipette prima di eseguire la PCR.
- La sterilizzazione in autoclave non elimina la contaminazione del DNA. Il flusso di lavoro nel laboratorio di PCR deve essere unidirezionale tra le distinte aree di lavoro: iniziare con la preparazione del campione, quindi l'amplificazione e infine il rilevamento. Non portare il DNA amplificato nelle aree destinate alla preparazione dei campioni.
- Tutte le pipette, i puntali delle pipette e qualsiasi apparecchiatura utilizzata in una determinata area devono essere dedicati a quella zona del laboratorio.
- Quando possibile, utilizzare materiale da laboratorio in plastica sterile monouso per evitare la contaminazione con RNasi e DNasi o la contaminazione crociata.
- Tutti gli strumenti e le apparecchiature devono essere sottoposti a manutenzione e calibrati in base alle raccomandazioni del produttore.
- Dopo aver portato la busta a temperatura ambiente, esaminare l'interno dell'imboccatura di ciascuna busta in polimero POP-7 nel punto di installazione. Verificare che l'attacco della busta sia privo di polimero secco o cristallizzato. Se si osserva cristallizzazione, non installare la busta sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx, onde evitare di compromettere le prestazioni del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay e dello strumento 3500xL o 3500xL Dx stesso. Se si osserva cristallizzazione, non installare la busta sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx e contattare l'Assistenza clienti Thermo Fisher.
- Se le prestazioni del dispositivo non sono quelle attese o se i risultati dei test non vengono interpretati correttamente, potrebbero essere generati risultati errati di mutazione di *FLT3* e, di conseguenza, potrebbero essere prese decisioni inadeguate per la gestione dei pazienti nel trattamento della LMA³.
 - Un risultato falso negativo del saggio potrebbe impedire a un paziente affetto da LMA di trarre il beneficio potenzialmente associato al trattamento con gilteritinib fumarato (XOSPATA[®]) o quizartinib cloridrato (VANFLYTA[®]). Tuttavia, il paziente riceverebbe una chemioterapia intensa come terapia standard per la LMA.
 - I pazienti con un risultato falso positivo del saggio potrebbero essere trattati con gilteritinib fumarato (XOSPATA[®]) o quizartinib cloridrato (VANFLYTA[®]) senza che ci sia alcuna aspettativa di beneficio. Per gli eventi avversi correlati a questi trattamenti, fare riferimento alle rispettive informazioni di prescrizione del produttore del prodotto farmaceutico.

NOTA: se si utilizzano campioni o reagenti errati e/o se non si seguono attentamente queste istruzioni, esiste il rischio di ritardo nei risultati che potrebbe determinare un ritardo nel trattamento.

- Qualsiasi incidente grave che si sia verificato in relazione al dispositivo deve essere notificato al produttore e all'autorità competente nello Stato membro dell'utilizzatore e/o del paziente.

9.1. Precauzioni di sicurezza informatica

Il software LeukoStrat CDx *FLT3* Software non richiede una connessione di rete. Per ridurre al minimo i rischi di sicurezza informatica, si raccomanda di utilizzare il software su un computer indipendente che non sia connesso a una rete. Se il software viene utilizzato su un computer connesso a una rete, si raccomanda di adottare le precauzioni riportate di seguito.

- I computer e le reti sono soggetti a rischi per la sicurezza se non vengono protetti e aggiornati periodicamente. Una corretta sicurezza dei computer e delle reti contribuisce a garantire che i dati non vengano compromessi, persi o danneggiati a causa di rischi informatici che è possibile prevenire. Dotare tutti i computer di un software antivirus aggiornato e attivato.
- Filtrare e proteggere il traffico di rete con un firewall.
- Conservare i dati su computer locali per ridurre i rischi di sicurezza informatica rappresentati dal trasferimento di dati sensibili tramite una rete.
- Installare il software solo per account di utenti locali senza privilegi di amministratore, onde evitare l'uso non autorizzato.
- Tenere Windows e Adobe Acrobat Reader sempre aggiornati alle ultime patch di sicurezza disponibili.
- Rimuovere dal computer tutto il software non essenziale e disabilitare l'accesso del browser al web.
- Accertarsi che il sistema operativo del computer si blocchi dopo un periodo di inattività dell'utente (ad es. 5 minuti).
- Installare solo aggiornamenti ottenuti direttamente dal produttore (ovvero Invivoscribe Inc.). L'installazione degli aggiornamenti di sicurezza segue la stessa procedura dell'installazione del software.
- Onde evitare la perdita di dati, si raccomanda di eseguire il backup dell'installazione del software e di tutti i risultati prodotti dal software.
- In Windows, impostare Adobe Acrobat Reader come programma predefinito di visualizzazione dei PDF. L'apertura di report dei campioni e delle corse in un browser Internet può rappresentare rischi di sicurezza informatica per i dati dei pazienti.
- Il software LeukoStrat CDx *FLT3* Software è stato validato con i seguenti programmi antivirus:
 - Symantec Endpoint Protection versione 14.3
 - McAfee Endpoint Security versione 10.7
 - ESET Endpoint Security versione 10.0

10. Raccolta e preparazione dei campioni

10.1. Precauzioni

- I campioni biologici umani possono contenere materiali potenzialmente infettivi. Maneggiare tutti i campioni conformemente agli standard riferibili ai patogeni a trasmissione ematica e/o al livello di biosicurezza 2 del proprio istituto.
- Il saggio è validato per sangue e midollo osseo anticoagulato con eparina sodica o EDTA.

10.2. Sostanze interferenti con la PCR

- Chelanti cationici divalenti
- Puntali per pipette a bassa ritenzione
- EDTA (non significativo a basse concentrazioni)

10.3. Requisiti e manipolazione dei campioni

- Per il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay sono necessari almeno 1 ml di sangue periferico o 0,25 ml di midollo osseo anticoagulati con eparina sodica o EDTA.
- I campioni possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di 7 giorni prima di essere analizzati.
- L'integrità delle provette dei campioni e del loro contenuto non deve essere compromessa (*ad es.* non devono essere congelate durante la spedizione).

11. Procedura del saggio

11.1. Ispezione dei campioni

- 11.1.1. Rimuovere i campioni di sangue periferico (PB) e/o aspirato midollare (BM) dal relativo imballaggio e scartarli se non soddisfano i requisiti riportati nella sezione 10.3.

11.2. Preparazione della processazione dei campioni

- 11.2.1. Eseguire la processazione dei campioni nello spazio di lavoro appositamente adibito per questa operazione.
- 11.2.2. Trasferire circa 14 ml di terreno RPMI-1640 per campione in provette coniche da 50 ml etichettate. Attendere che il terreno raggiunga la temperatura ambiente per almeno 1 ora e 45 minuti.
 - Se il terreno RPMI-1640 raffreddato viene aliquotato in provette coniche da 15 ml, attendere che raggiunga la temperatura ambiente per almeno 45 minuti.
- 11.2.3. Per ogni campione, aliquotare 3 ml di terreno per gradiente di densità in una provetta conica da 15 ml etichettata.
 - Se il terreno per gradiente di densità è stato conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, attendere che le aliquote raggiungano la temperatura ambiente per 1 ora prima dell'uso.
- 11.2.4. Trasferire circa 200 µl di DPBS per campione in una provetta di volume appropriato etichettata e attendere che raggiunga la temperatura ambiente per almeno 45 minuti prima dell'uso.

11.3. Diluizione dei campioni clinici

NOTA: nel presente manuale sono incluse le istruzioni per l'impiego di un QIAcube per l'estrazione del DNA. L'uso di un QIAcube è consigliato, ma non necessario. Se si utilizza un QIAcube, riservare uno spazio al controllo di estrazione.

- 11.3.1. Mescolare le provette contenenti i campioni capovolgendole 4-6 volte. Aggiungere le aliquote di campione (1-3 ml di sangue periferico o 0,25-0,75 ml di midollo osseo) nelle provette coniche da 15 ml etichettate in maniera univoca.
- 11.3.2. Aggiungere il terreno RPMI-1640 a ogni aliquota di campione per portare il volume totale a 6 ml. Chiudere bene le provette e mescolarne delicatamente il contenuto capovolgendole 3-5 volte o pipettando su e giù finché la miscela non presenta una consistenza uniforme.
- 11.3.3. Eventuali campioni residui possono essere conservati a 2-8 °C.

11.4. Isolamento delle cellule mononucleate (MNC)

- 11.4.1. Con una pipetta di trasferimento, depositare il campione diluito di sangue periferico o di midollo osseo sulla superficie superiore del terreno per gradiente di densità. Inclinare la provetta contenente il terreno per gradiente di densità e, contemporaneamente, pipettare molto lentamente il campione sopra di esso per evitare che gli strati si mescolino fra loro.
- 11.4.2. Dopo aver pipettato tutto il campione, mettere delicatamente la provetta in posizione verticale e tapparla bene.
- 11.4.3. Centrifugare le provette coniche da 15 ml con i parametri seguenti e assicurarsi che il sistema di frenatura sia completamente disattivato:

- forza = 400 x g (rcf)
 - tempo = 30 minuti
 - temperatura = 20 °C
 - accel/decel = minima
- 11.4.4. Per ogni campione da analizzare, aliquotare 6 ml di terreno RPMI-1640 in una nuova provetta conica da 15 ml etichettata.
- 11.4.5. Dopo la centrifugazione, utilizzare una pipetta di trasferimento per aspirare lentamente lo strato di MNC o fino a rimuoverne non più di 3 ml.
- 11.4.6. Dispensare la sospensione dello strato raccolto di MNC nella provetta conica da 15 ml opportunamente etichettata contenente 6 ml di terreno RPMI-1640. Tappare la provetta e mescolare capovolgendola delicatamente 3-5 volte.
- 11.4.7. Centrifugare le provette coniche con i seguenti parametri:
- forza = 355-364 x g (rcf)
 - tempo = 10 minuti
 - temperatura = 20 °C
 - accel/decel = massima
- 11.4.8. Rimuovere il supernatante dal pellet cellulare capovolgendo la provetta solo una volta prima di rimetterla in posizione verticale. Risospendere il pellet nel liquido residuo picchiettando la provetta 10-15 volte o fino a quando il pellet non è risospeso.
- 11.4.9. Aggiungere 1 ml di terreno RPMI-1640 al pellet cellulare risospeso. Tappare la provetta e mescolare delicatamente picchiettandola 6-8 volte.
- 11.4.10. Collocare le provette contenenti i campioni in un bagno di acqua e ghiaccio fino al termine della conta delle cellule mononucleate.

11.5. Conta delle cellule mononucleate

- 11.5.1. Eseguire la conta delle cellule mononucleate con un sistema per conta cellulare adatto.
- 11.5.2. Utilizzare il minimo volume possibile per le conte cellulari per garantire che rimanga una quantità adeguata di DNA per il saggio.
- Eliminare il campione utilizzato per la conta cellulare.

11.6. Preparazione dei campioni per l'estrazione del DNA e completamento dell'isolamento

- 11.6.1. Se la concentrazione riportata è ≤5 milioni di cellule/ml, viene processato l'intero volume della sospensione cellulare. Passare al punto 11.6.3.
- 11.6.2. Se la concentrazione riportata è >5 milioni di cellule/ml, calcolare il volume di campione che contiene 5 milioni di cellule vive (V_i) poiché le colonne di centrifugazione QIAcube non possono accogliere una quantità di cellule superiore a 5 milioni.
- 11.6.2.1. Utilizzare l'equazione $C_i V_i = C_f V_f$ per ottenere il valore di V_i per ciascuno di questi campioni.
- C_i = concentrazione cellulare (cellule/ml) ottenuta dalla conta delle MNC
 - C_f = concentrazione finale (5 milioni di cellule/ml)
 - V_f = volume finale (1 ml)
 - $V_i = \frac{5.000.000 \frac{\text{cellule}}{\text{ml}} \times 1 \text{ ml}}{C_i}$
- 11.6.2.2. Utilizzare l'equazione $V_f - V_i$ per ottenere il volume di terreno RPMI-1640 da aggiungere al V_i per portare il volume fino a 1000 µl.
- 11.6.2.3. Mescolare delicatamente le provette contenenti >5 milioni di cellule/ml picchiettandole 6-8 volte.
- 11.6.2.4. Per ogni campione, trasferire i volumi calcolati in una provetta conica da 15 ml etichettata.
- 11.6.3. Centrifugare le provette coniche dei campioni da 15 ml contenenti le sospensioni cellulari con i parametri seguenti:
- forza = 355-364 x g (rcf)
 - tempo = 10 minuti
 - temperatura = 20 °C
 - accel/decel = massima
- 11.6.4. Con una pipetta di trasferimento, aspirare il supernatante dai pellet di cellule. Potrebbe rimanere un piccolo volume di terreno.
- 11.6.5. Picchiettare le provette coniche da 15 ml 10-15 volte o finché i pellet non si staccano dalle provette.
- 11.6.6. Aggiungere 200 µl di DPBS e mescolare delicatamente picchiettando le provette 10-15 volte per risospendere le cellule. Collocare le provette tappate di questi campioni nel bagno di acqua e ghiaccio.

11.7. Preparazione della stazione di automazione QIAcube

NOTA: nel presente manuale sono incluse le istruzioni per l'impiego di un QIAcube per l'estrazione del DNA. L'uso di un QIAcube è consigliato, ma non necessario. L'estrazione del DNA può essere effettuata con il Qiagen DSP DNA Blood Mini Kit senza un QIAcube.

- 11.7.1. Tutti i passaggi relativi alla stazione di automazione QIAcube, comprese le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione, pulizia e manutenzione, vengono effettuati in base alle istruzioni del produttore, salvo diversamente specificato di seguito.
 - 11.7.1.1. Seguire le linee guida QIAgen per le operazioni di manutenzione della stazione di automazione QIAcube, con un'unica eccezione: eseguire la prova di tenuta con cadenza mensile anziché semestrale.
- 11.7.2. Preparare la stazione di automazione QIAcube per l'uso, caricando materiali e reagenti sullo strumento.
 - 11.7.2.1. In una stazione QIAcube è possibile processare fino a 12 provette; tuttavia, uno degli spazi è riservato al controllo di estrazione (utilizzato come controllo di contaminazione dell'estrazione e controllo negativo della PCR). Non è possibile processare 1 o 11 provette a causa dello sbilanciamento della centrifuga.
 - 11.7.2.2. Se il numero di estrazioni necessarie, compreso il controllo di estrazione, è di 11 provette, è possibile impiegare provette del bianco, utilizzando DPBS.
- 11.7.3. Prelevare una provetta di controllo di estrazione (EC) dal freezer in cui è conservata tra -30 °C e -15 °C e scongelarla a temperatura ambiente. Le provette di controllo EC possono essere rimesse in freezer dopo l'uso. Tenere traccia del numero di cicli di congelamento e scongelamento.
- 11.7.4. Passare al vortex la provetta EC alla MASSIMA velocità per 5-15 secondi. Centrifugare la provetta per 2-5 secondi se è presente liquido nel coperchio. Aggiungere 200 µl di controllo di estrazione in una provetta dei campioni. Questa provetta EC può essere tappata e conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino a quando la corsa non sarà pronta.

11.8. Estrazione del DNA

NOTA: nel presente manuale sono incluse le istruzioni per l'impiego di un QIAcube per l'estrazione del DNA. L'uso di un QIAcube è consigliato, ma non necessario. L'estrazione del DNA può essere effettuata con il Qiagen DSP DNA Blood Mini Kit senza un QIAcube.

- 11.8.1. Pipettare su e giù 4-11.6.611.6.6) per risospendere le cellule. Trasferire l'intero volume delle sospensioni cellulari in DPBS nelle provette dei campioni. Assicurarsi che la maggior parte della soluzione si trovi sul fondo della provetta.
- 11.8.2. Collocare la provetta del controllo di estrazione nell'ultima posizione della corsa.
- 11.8.3. Caricare sullo strumento tutte le restanti provette dei campioni, i reagenti e la soluzione di proteasi aliquotata.
- 11.8.4. Avviare la corsa, accertandosi che siano selezionate le opzioni indicate di seguito.
 - 11.8.4.1. Utilizzare il protocollo QIAamp DNA Blood Mini.
 - 11.8.4.2. Selezionare **Blood or body fluid** (Sangue o fluido corporeo) come materiale iniziale.
 - 11.8.4.3. Impostare *Elution volume* (Volume di eluzione) su **100 µl**.
- 11.8.5. Al termine dell'estrazione,appare le provette contenenti i campioni di DNA e conservarle a 2-8 °C fino al momento della quantificazione.

11.9. Quantificazione e diluizione del DNA

- 11.9.1. Tutti i passaggi relativi allo spettrofotometro per microvolumi a UV, comprese le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione, pulizia e manutenzione, vengono effettuati in base alle istruzioni del produttore, salvo diversamente specificato di seguito.
- 11.9.2. Passare al vortex le provette contenenti i campioni di DNA alla MASSIMA velocità per 5-15 secondi. Utilizzando una microcentrifuga, centrifugare le provette contenenti i campioni di DNA per 2-5 secondi per rimuovere il liquido dai coperchi.
- 11.9.3. Eseguire l'azzeramento dello strumento contro il bianco utilizzando 2 µl di tampone AE.
- 11.9.4. Effettuare la lettura di 2 µl di ogni campione di DNA in singolo.
- 11.9.5. Se la lettura della concentrazione di un campione di DNA è $\leq 9,4$ ng/µl, ripetere altre due volte la quantificazione del campione utilizzando aliquote fresche di 2 µl. Onde evitare letture imprecise con lo spettrofotometro per microvolumi a UV, assicurarsi che il campione sia ben mescolato. La media di queste tre letture viene considerata la concentrazione finale del DNA.

NOTA: se il valore di quantificazione finale è $\leq 9,4$ ng/µl, il campione di DNA non può essere analizzato con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Processare nuovamente il campione per ottenere DNA adeguato.

NOTA: se il valore di quantificazione finale del controllo di estrazione è $\leq 9,4$ ng/µl, i campioni di DNA associati non possono essere analizzati con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Processare nuovamente questi campioni per ottenere DNA adeguato.

- 11.9.6. I campioni di DNA possono essere conservati non diluiti a una temperatura compresa tra -30 °C e -15 °C per un massimo di un anno. In alternativa, i campioni di DNA non diluiti o diluiti a 10 ng/µl possono essere conservati a 2-8 °C per un massimo di 7 giorni.

NOTA: il DNA non diluito può essere sottoposto a un massimo di cinque (5) cicli di congelamento e scongelamento.

11.9.7. I campioni di DNA con concentrazione $\geq 10,5$ ng/ μ l devono essere diluiti a 10 ng/ μ l in tampone AE utilizzando provette a superficie non legante. Utilizzare l'equazione $C_i V_i = C_f V_f$, per ottenere il valore V_i dopo aver ricavato il volume finale (V_f) dalla Tabella 4.

- $V_i = \frac{(V_f \times 10 \frac{ng}{\mu l})}{C_i}$
- C_i = concentrazione del DNA ottenuta con la lettura dello spettrofotometro per microvolumi a UV
- C_f = concentrazione finale del DNA (10 ng/ μ l)
- V_i = volume di DNA non diluito da diluire
- V_f = volume finale di DNA diluito (ricavato dalla Tabella 4)
- $V_f - V_i$ = quantità di tampone AE da aggiungere al V_i

Tabella 4: Determinazione dei volumi finali in base al valore di quantificazione

Concentrazione del DNA ottenuta con lo spettrofotometro per microvolumi a UV (C_i)	Volume finale (V_f)
$C_i \leq 9,4$ ng/ μ l	Non analizzabile
$9,5 \leq C_i \leq 10,4$ ng/ μ l	Analizzare così com'è
$10,5 \leq C_i \leq 50,4$ 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

11.10. Amplificazione

NOTA: completare tutti i passaggi riportati in questa sezione lo stesso giorno per una corsa ITD o TKD.

NOTA: ridurre al minimo l'esposizione delle master mix alla luce.

NOTA: ridurre al minimo il tempo durante il quale la Taq rimane fuori dal freezer in cui è conservata tra -30 °C e -15 °C.

- 11.10.1. Eseguire tutti i passaggi relativi al termociclatore Veriti Dx, comprese le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione, pulizia e manutenzione, in base alle istruzioni del produttore, salvo diversamente specificato di seguito.
- 11.10.2. Attendere che le master mix (master mix ITD e master mix TKD) si scongelino a temperatura ambiente. Prelevare le provette di controllo (controllo positivo ITD, controllo positivo TKD, controllo di estrazione e controllo senza template) dal freezer in cui sono conservate e scongelarle a temperatura ambiente. Rimettere le provette di controllo in freezer dopo l'uso, tenendo traccia del numero di cicli di congelamento e scongelamento. Mentre i reagenti raggiungono la temperatura ambiente, etichettare piastre a 96 pozzetti distinte con PCR ITD o PCR TKD, come pertinente, e un identificatore univoco.

NOTA: analizzare tutti i campioni sulla stessa piastra per PCR del controllo di estrazione associato.

11.10.3. Determinare il numero di pozzetti della piastra (campioni, controlli positivi TKD, controlli positivi ITD, controlli di estrazione e controllo senza template) da analizzare sulle piastre ITD e TKD. Il numero totale di pozzetti da analizzare per piastra ITD o TKD è = X. Per evitare problemi di variabilità durante il pipettamento di piccoli volumi di reagente, il valore minimo di X è due (2).

11.10.3.1. Calcolare i volumi di master mix e Taq necessari:

- Volume totale di master mix = 45 μ l \times (X + 3)
- Volume totale di Taq = 0,2 μ l \times (X + 3)
- Gli ulteriori tre (3) campioni aggiunti a X servono per compensare gli errori di pipettamento.

- 11.10.4. Passare al vortex la master mix, i controlli e le provette contenenti i campioni di DNA alla MASSIMA velocità per 5-15 secondi.
- 11.10.5. Prelevare la Taq dal freezer in cui è conservata tra -30 °C e -15 °C. Non passarlo al vortex.
- 11.10.6. Utilizzando una microcentrifuga, centrifugare tutte le provette (compresa la Taq) per 2-5 secondi per rimuovere il liquido dai coperchi.
- 11.10.7. Aggiungere i volumi calcolati di master mix e Taq nelle provette etichettate di volume appropriato per le piastre ITD e TKD.
- 11.10.8. Tappare le provette e passarle al vortex alla velocità MASSIMA per 5-15 secondi per mescolarne il contenuto. Quando possibile, utilizzare una microcentrifuga per centrifugare per 2-5 secondi. Rimettere la Taq nel freezer in cui era conservata tra -30 °C e -15 °C.
- 11.10.9. Aliquotare 45 μ l della miscela di master mix e Taq nei pozzetti appropriati in base alla disposizione della piastra per PCR.
- 11.10.10. Aggiungere 5 μ l dei campioni di DNA a 10 ng/ μ l e dei controlli nei pozzetti appropriati della piastra a 96 pozzetti, in base alla disposizione della piastra per PCR.
- 11.10.11. Sigillare le colonne della piastra per PCR con strip di tappi. Centrifugare la piastra a 96 pozzetti a 1400 \times g per 1 minuto.
- 11.10.12. Collocare la piastra per PCR in un termociclatore Veriti Dx e chiudere il coperchio. Programmare il termociclatore con le fasi indicate nella Tabella 5.

Tabella 5: Programmi del termociclatore per l'amplificazione PCR

Fase	Programma <i>FLT3</i> ITD CDx	Programma <i>FLT3</i> TKD CDx
1	95 °C per 11 minuti	94,5 °C per 11 minuti
2	94 °C per 30 secondi	93,5 °C per 30 secondi
3	57 °C per 60 secondi	56,5 °C per 60 secondi
4	72 °C per 2 minuti	71,5 °C per 2 minuti
5	Ripetere le fasi da 2 a 4 per 24 volte	Ripetere le fasi da 2 a 4 per 28 volte
6	94 °C per 30 secondi	93,5 °C per 30 secondi
7	60 °C per 45 minuti	59,5 °C per 45 minuti
8	4 °C ∞	4 °C ∞
Velocità di rampa 75%.		

- 11.10.13. Premere **Run** (Esegui) per procedere alla schermata successiva. Assicurarsi che il volume di reazione sia impostato su 50 µl, che la temperatura del coperchio sia impostata su 105,0 °C e che il coperchio sarà riscaldato per la corsa. Premere **Start Run Now** (Avvia corsa ora) per iniziare la corsa.
- 11.10.14. Conservare i reagenti e il DNA residui. Conservare a una temperatura compresa tra -30 °C e -15 °C le master mix che sono state aperte. Tenere traccia del numero di cicli di congelamento e scongelamento.
- 11.10.15. Al termine del protocollo di PCR, la piastra per PCR può essere conservata a 2-8 °C per un massimo di 72 ore. In alternativa, per le piastre TKD continuare alla sezione 11.11: *Digestione con enzimi di restrizione (solo mutazione TKD)* mentre per le piastre ITD continuare alla sezione 11.12: *Rilevamento con elettroforesi capillare*.

11.11. Digestione con enzimi di restrizione (solo mutazione TKD)

NOTA: completare tutti i passaggi riportati in questa sezione lo stesso giorno.

NOTA: effettuare la digestione con enzimi di restrizione solo sugli ampliconi TKD.

NOTA: ridurre al minimo il tempo in cui EcoRV rimane fuori dal freezer in cui è conservato tra -30 °C e -15 °C.

- 11.11.1. Attendere che una provetta di NEBuffer r3.1 si scongeli a temperatura ambiente.
- 11.11.2. Mentre i reagenti raggiungono la temperatura ambiente, etichettare una piastra a 96 pozzetti con Digestione TKD e un identificatore univoco.
- 11.11.3. Stabilire il numero di pozzetti (campioni e controlli) da usare per la digestione sulla piastra. Il numero totale di campioni da sottoporre a digestione è = Y.
- Per evitare problemi di variabilità durante il pipettamento di piccoli volumi di reagente, il valore minimo di Y è quattro (4).
- 11.11.3.1. Calcolare i volumi necessari di NEBuffer r3.1 ed EcoRV.
- Volume totale di NEBuffer r3.1 = 1,1 µl × (Y + 6)
 - Volume totale di EcoRV = 0,5 µl × (Y + 6)
 - Gli ulteriori sei (6) campioni aggiunti a Y servono per compensare gli errori di pipettamento.
- 11.11.4. Passare al vortex le provette di NEBuffer r3.1 alla MASSIMA velocità per 5-15 secondi.
- 11.11.5. Prelevare EcoRV dal freezer in cui è conservato tra -30 °C e -15 °C. Non passarlo al vortex.
- 11.11.6. Utilizzando una microcentrifuga, centrifugare tutte le provette (compreso EcoRV) per 2-5 secondi per rimuovere il liquido dai coperchi.
- 11.11.7. Aggiungere i volumi calcolati di NEBuffer r3.1 e di EcoRV in una provetta di volume appropriato etichettata.
- 11.11.8. Mescolare la soluzione pipettando su e giù 5-10 volte. Rimettere EcoRV nel freezer in cui era conservato tra -30 °C e -15 °C.
- 11.11.9. Aliquotare 1,5 µl della soluzione della mix di digestione nei pozzetti appropriati della piastra di digestione.
- 11.11.10. Rimuovere la piastra per PCR TKD dal termociclatore o dal frigorifero in cui è conservata a 2-8 °C (non è necessario attendere che raggiunga la temperatura ambiente) e centrifugarla a 1400×g per 1 minuto.
- 11.11.11. Aggiungere 8,5 µl dei campioni della piastra per PCR nei pozzetti appropriati della piastra di digestione. Sigillare le colonne della piastra di digestione con strip di tappi.
- 11.11.12. Centrifugare la piastra a 1400×g per 1 minuto.
- 11.11.13. Collocare la piastra di digestione in un termociclatore Veriti Dx e chiudere il coperchio.
- 11.11.14. Programmare il termociclatore con le fasi indicate di seguito (velocità di rampa 75%).
- Fase 1: 37 °C per 1 ora
 - Fase 2: 65 °C per 10 minuti
 - Fase 3: 4 °C per ∞ (durata illimitata)
- 11.11.15. Premere **Run** (Esegui) per procedere alla schermata successiva. Assicurarsi che il volume di reazione sia impostato su 10 µl, che la temperatura del coperchio sia impostata su 105,0 °C e che il coperchio sarà riscaldato per la corsa. Premere **Start Run Now** (Avvia corsa ora) per iniziare la corsa.

- 11.11.16. Al termine del protocollo di digestione, la piastra di digestione può essere conservata a 2-8 °C per un massimo di 72 ore, riducendo al minimo l'esposizione alla luce. In alternativa, continuare alla sezione *Rilevamento con elettroforesi capillare* (11.12).

11.12. Rilevamento con elettroforesi capillare

- NOTA:** ridurre al minimo il tempo in cui la provetta di LIZ Size Standard rimane fuori dal frigorifero in cui è conservata a 2-8 °C.
- NOTA:** lo strumento 3500xL e 3500xL Dx analizzano i campioni in set di 24 capillari, chiamati un'iniezione, che comprende tre (3) colonne per otto (8) righe su una piastra a 96 pozzetti. Ogni capillare corrisponde a un pozzetto. Sebbene le iniezioni possano essere programmate indipendentemente, non sono possibili iniezioni parziali.

- 11.12.1. Tutti i passaggi relativi agli strumenti 3500xL e 3500xL Dx, comprese le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione, pulizia e manutenzione, vengono effettuati in base alle istruzioni del produttore, salvo diversamente specificato di seguito.
- 11.12.2. I saggi ITD e TKD devono essere eseguiti in iniezioni diverse con condizioni diverse. Le condizioni per i saggi ITD e TKD con gli strumenti 3500xL e 3500xL Dx sono indicate nella Tabella 6 qui di seguito. Queste impostazioni sono fornite in file XML che possono essere importati negli strumenti e salvati sugli strumenti ABI 3500xL e 3500xL Dx per uso futuro.

Tabella 6: Condizioni per gli analizzatori genetici 3500xL e 3500xL Dx

Parametro	Parametri per il saggio CDx per ITD	Parametri per il saggio CDx per TKD
Tempo di iniezione	12 s	7 s
Tensione di iniezione	1,2 kvolt	1,0 kvolt
Lunghezza capillari	50 cm	
Polimero	POP-7	
Set di coloranti	G5	
Temperatura forno	60 °C	
Durata corsa	1630 s	
Tensione corsa	19,5 kvolt	
Durata pre-corsa	180 s	
Tensione pre-corsa	15 kvolt	
Ritardo dati	1 s	

- 11.12.3. Fare clic su **Refresh** (Aggiorna) per aggiornare il tempo di permanenza dei materiali di consumo sullo strumento e il numero di iniezioni eseguite sul dashboard dello strumento 3500xL o 3500xL Dx. Controllare il dashboard dello strumento 3500xL o 3500xL Dx per assicurarsi che i tamponi, il polimero e i capillari non abbiano superato il tempo massimo di permanenza sullo strumento consentito per questo saggio, indicato nella Tabella 7. Verificare che il numero di campioni (non solo le iniezioni) rimanenti per il polimero POP-7 sia sufficiente per la corsa. Qualora fosse necessario sostituire un materiale di consumo, eseguire le operazioni di manutenzione necessarie prima di continuare.

Tabella 7: Tempi massimi consentiti di permanenza dei materiali sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx

Materiale per 3500xL (Dx)	Tempo massimo consentito di permanenza sullo strumento
Polimero POP-7	7 giorni
Tampone per anodo	7 giorni
Tampone per catodo	7 giorni
Array di capillari 3500xL	400 iniezioni
o Array di capillari 3500xL Dx	160 iniezioni

11.13. Preparazione della soluzione di standard di riferimento, se necessario

- 11.13.1. La soluzione di standard di riferimento è costituita da una miscela di LIZ Size Standard e formammide Hi-Di.
- 11.13.2. Prelevare una provetta della soluzione di standard di riferimento dal frigorifero in cui è conservata a 2-8 °C, se disponibile, e andare al passaggio 11.13.6. Qualora non fosse disponibile, preparare una soluzione di standard di riferimento eseguendo i tre passaggi indicati di seguito.
- 11.13.3. Attendere che un flacone di formammide Hi-Di si scongeli a temperatura ambiente. Prelevare una provetta di LIZ Size Standard dal frigorifero in cui è conservata.
- 11.13.4. Passare al vortex le provette alla MASSIMA velocità per 5-15 secondi. Centrifugare le provette per 2-5 secondi in una microcentrifuga.

- 11.13.5. Aggiungere 56 µl di LIZ Size Standard a 1 ml di formammide Hi-Di. Etichettare la provetta della soluzione di standard di riferimento apponendovi la data.
- 11.13.6. Passare al vortex la provetta della soluzione di standard di riferimento alla MASSIMA velocità per 5-15 secondi. Centrifugare la provetta con la miscela per 2-5 secondi in una microcentrifuga. L'eventuale soluzione non utilizzata può essere conservata a 2-8 °C per un massimo di 7 giorni. Gettarla via dopo 7 giorni.

11.14. Preparazione della piastra dei campioni

- 11.14.1. Centrifugare la piastra a 96 pozzetti della PCR ITD e/o della digestione TKD a 1400×g per 1 minuto.
- 11.14.2. Etichettare una piastra a 96 pozzetti con ITD CE e/o TKD CE, come pertinente, e un identificatore univoco.

NOTA: i saggi ITD e TKD possono essere eseguiti entrambi sulla stessa piastra, ma devono essere separati in iniezioni diverse.

- 11.14.3. Stabilire il numero di pozzetti necessari per una corsa.
- Numero di pozzetti = 24X
 - X = numero di iniezioni.
 - Calcolare il volume necessario di soluzione di standard di riferimento.
 - Volume massimo di soluzione di standard di riferimento = 9,5 µl × (24X + 4)
 - Gli ulteriori quattro (4) campioni aggiunti a X servono per compensare gli errori di pipettamento.
- 11.14.4. Aggiungere 9,5 µl di soluzione di standard di riferimento nei pozzetti della piastra per CE contenente i campioni. Aggiungere 9,5 µl di soluzione di standard di riferimento o di sola formammide Hi-Di in eventuali pozzetti rimanenti che saranno sottoposti a iniezione (multiplo di 24), ma che non contengono campioni.

NOTA: tutti i 24 pozzetti facenti parte di un'iniezione devono contenere campione mescolato con soluzione di standard di riferimento, solo soluzione di standard di riferimento o solo formammide Hi-Di.

- 11.14.5. Da ogni pozzetto di PCR (solo ITD) o pozzetto di digestione (solo TKD), trasferire 0,5 µl di prodotto di PCR o di digestione nel pozzetto corrispondente sulla piastra per CE servendosi di una pipetta multicanale.

NOTA: è possibile utilizzare una pipetta monocanale per trasferire il prodotto di PCR o di digestione quando si ripete l'analisi di singoli pozzetti.

- 11.14.6. Sigillare la piastra per CE con un foglio di alluminio e centrifugare la piastra a 1400×g per 1 minuto.
- 11.14.7. Collocare la piastra per CE in un termociclatore Veriti Dx e chiudere il coperchio.
- 11.14.8. Programmare il termociclatore con le fasi indicate di seguito (velocità di rampa 75%).
- Fase 1: 95 °C per 3 minuti
 - Fase 2: 4 °C per 5 minuti
- 11.14.9. Premere **Run** (Esegui) per procedere alla schermata successiva. Assicurarsi che il volume di reazione sia impostato su 10 µl, che la temperatura del coperchio sia impostata su 105,0 °C e che il coperchio sarà riscaldato per la corsa. Premere **Start Run Now** (Avvia corsa ora) per iniziare la corsa.
- 11.14.10. Al termine della corsa, verificare che non siano presenti bollicine ispezionando visivamente i pozzetti della piastra. Rimuovere eventuali bollicine centrifugando la piastra per CE a 1400×g per 1 minuto.
- 11.14.11. Preparare ciascun gruppo piastra collocando la piastra per CE su una base per piastra a 96 pozzetti per lo strumento 3500xL o 3500xL Dx e verificare che le scanalature degli angoli siano allineate. Rimuovere il sigillo in alluminio e collocare nuovi setti per piastre a 96 pozzetti sulla piastra, verificando che i setti siano completamente piatti e che nessuno dei loro fori sia ostruito. Fare scattare in posizione un fermapietra per piastra a 96 pozzetti per lo strumento 3500xL o 3500xL Dx.

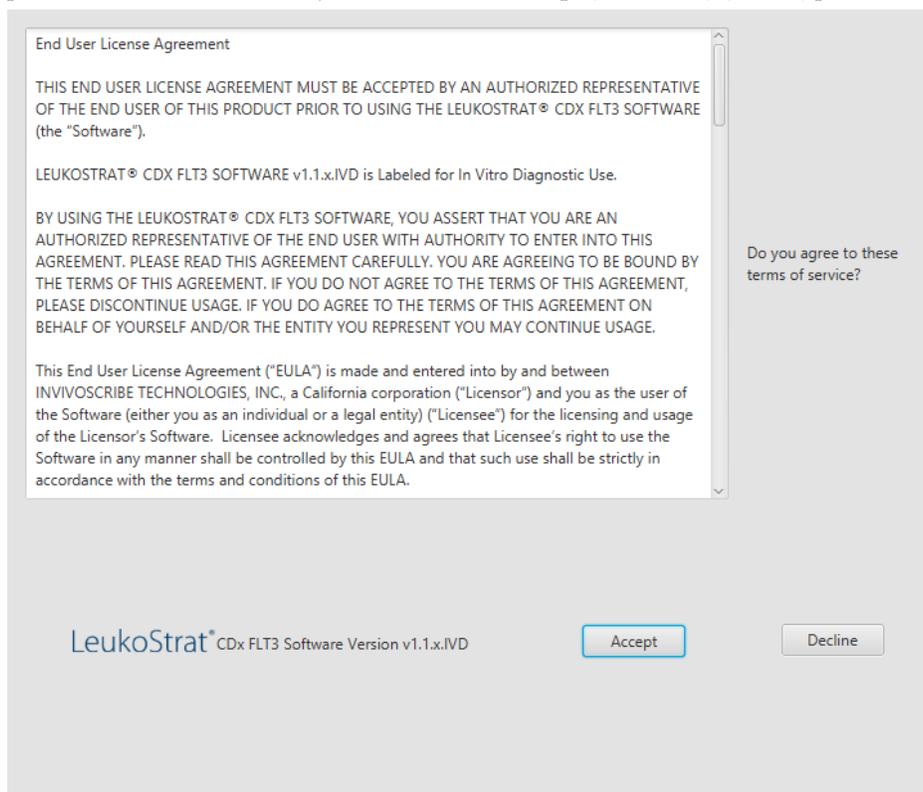
11.15. Impostazione di PlateMapper con il software LeukoStrat CDx *FLT3* Software

NOTA: per installare il software LeukoStrat® CDx *FLT3* Software è necessaria l'autorizzazione dell'amministratore.

11.15.1. Installare il software LeukoStrat CDx *FLT3* Software.

- 11.15.1.1. Copiare il file d'installazione *LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi* dal CD del software a un'unità locale sul computer.
- 11.15.1.2. Fare doppio clic sul file **LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi**.
 - 11.15.1.2.1. Se dopo aver fatto doppio clic sul file msi, viene visualizzato un messaggio di *Microsoft Defender SmartScreen*, fare clic su **More info** (Ulteriori informazioni).
 - 11.15.1.2.2. Verificare che l'autore della pubblicazione sia Invivoscribe, Inc. Per procedere con l'installazione, fare clic su **Run anyway** (Esegui comunque).
- 11.15.1.3. Sarà visualizzata la casella di dialogo della procedura d'installazione guidata di *LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi*. Fare clic su **Next** (Avanti).
- 11.15.1.4. Il percorso d'installazione predefinito è *C:\Invivoscribe\LeukoStratCDx-1.1.x.IVD*. Fare clic su **Next** (Avanti).
- 11.15.1.5. Fare clic su **Install** (Installa). A questo punto inizia l'installazione.
- 11.15.1.6. Sarà visualizzata la finestra di dialogo *User Account Control* (Controllo account utente). Fare clic su **Yes** (Sì).
- 11.15.1.7. Fare clic su **Finish** (Fine) per uscire dalla procedura d'installazione guidata.

11.15.2. Aprire il *LeukoStrat CDx FLT3 Software*. Fare clic su **Accept** () (Accetta) per accettare i termini del servizio.



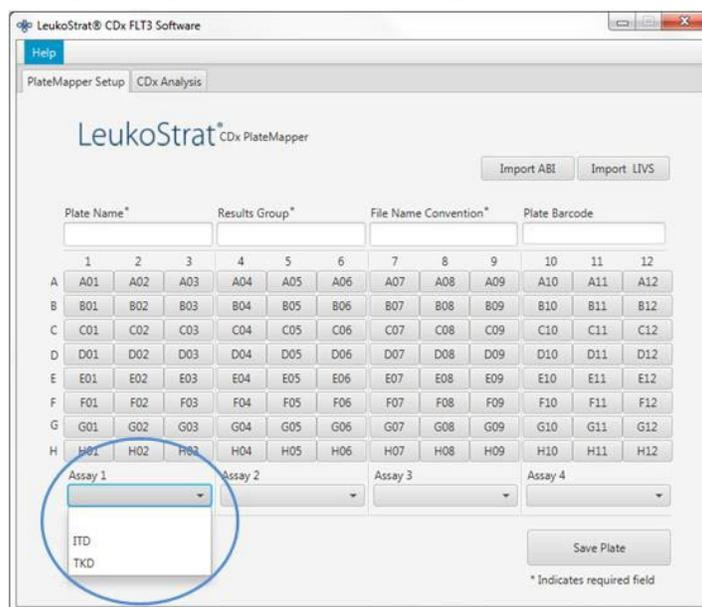
11.15.3. Nella schermata *PlateMapper Setup* (Configurazione PlateMapper), compilare i tre campi obbligatori situati al di sopra della mappa della piastra. Tali campi obbligatori sono: *Plate Name* (Nome piastra), *Results Group* (Gruppo risultati) e *File Name Convention* (Convenzione nome file) (cerchiati nella figura di seguito).

11.15.3.1. I nomi delle mappe delle piastre possono contenere al massimo 50 caratteri alfanumerici (A-Z, a-z, 0-9), spazi singoli e trattini.

11.15.3.2. Le voci *Results Group* (Gruppo risultati) e *File Name Convention* (Convenzione nome file) devono corrispondere ai nomi delle rispettive voci programmate dall'utente sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx (selezionate nel passaggio 11.16.14).

11.15.4. Nella mappa della piastra sono consentiti quattro saggi per piastra (tre colonne per saggio). Ogni saggio corrisponde all'iniezione che si verificherà durante la corsa sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx. Può essere eseguito solo un saggio per iniezione (ITD o TKD).

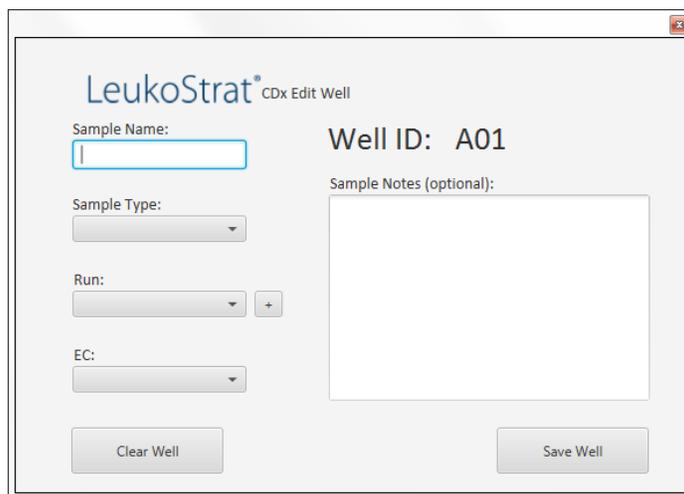
11.15.5. Selezionare il saggio dal menu a discesa () che corrisponde ai campioni situati sopra di esso nella schermata *PlateMapper Setup* (Configurazione PlateMapper).



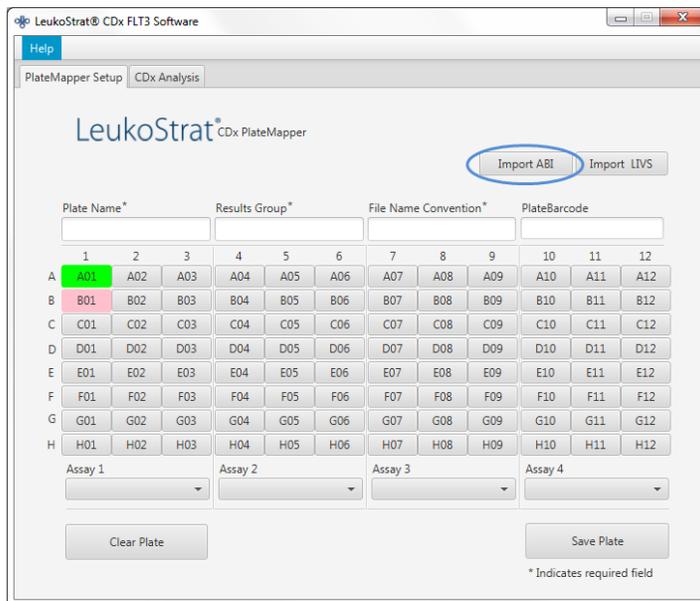
11.15.6. Nella mappa della piastra, inserire le opportune informazioni per ogni pozzetto che conterrà un campione o controllo da analizzare.

NOTA: quando si inseriscono le informazioni relative ai pozzetti, inserire per prime le informazioni contenenti i tipi di campione *controllo di estrazione (EC)*, *controllo positivo (PC)* e *controllo senza templatato (NTC)*. I controlli possono essere posizionati in qualsiasi punto della piastra, non necessariamente nei primi tre pozzetti. Inserire le informazioni relative ai pozzetti contenenti il tipo di campione *SAMPLE (CAMPIONE)* dopo, poiché andranno associate al rispettivo controllo di estrazione. I controlli positivi e i controlli senza templatato non sono associati ai controlli di estrazione.

11.15.6.1. Per inserire le informazioni, fare clic sul pozzetto di interesse (*ad es.* A01); si aprirà la seguente finestra:

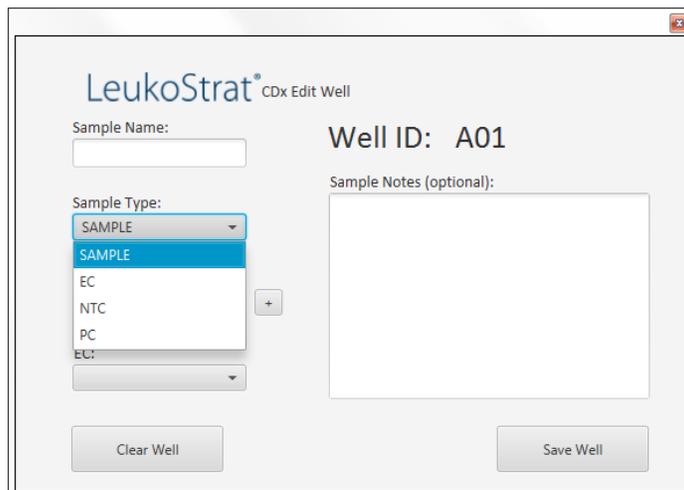


- 11.15.7. Inserire nel campo *Sample Name* (Nome campione) un nome che descriva il pozzetto. I nomi dei campioni possono contenere al massimo 50 caratteri alfanumerici (A-Z, a-z, 0-9), spazi singoli e trattini.
- 11.15.7.1. L'utente può, inoltre, importare i nomi dei campioni nella mappa della piastra utilizzando il *file 3500 Plate Layout versione 1.0* di Thermo Fisher Scientific. Inserire i nomi dei campioni nel *file 3500 Plate Layout* e importare utilizzando il pulsante **Import ABI** (Importa ABI).



- 11.15.8. Selezionare il tipo di campione nel menu a discesa del campo **Sample Type** (Tipo di campione) del pozzetto. Le opzioni selezionabili sono:

- SAMPLE (CAMPIONE) = sconosciuto
- EC = Controllo di estrazione
- NTC = Controllo senza template
- PC= Controllo positivo



- 11.15.9. Selezionare il numero della corsa nel menu a discesa del campo **Run Number** (Numero corsa). Per aggiungere un nuovo numero di corsa, fare clic sul segno “+” situato accanto al menu a discesa.

NOTA: una “corsa” è definita da tutti i campioni, un replicato del controllo positivo, tutti i controlli di estrazione associati ai campioni da analizzare e un replicato del controllo senza template. Le corse possono comprendere più iniezioni e più corse possono essere analizzate su un’unica piastra.

- 11.15.9.1. Selezionare l’**EC** associato nel menu a discesa del campo EC (richiesto solo se il *Sample type* [Tipo di campione] è *SAMPLE* [CAMPIONE]). A un singolo controllo di estrazione possono essere associati fino a 11 campioni.

- 11.15.10. Ulteriori commenti sul campione o sul controllo possono essere inseriti nel campo *Sample Notes* (Note sul campione). Tali commenti appariranno nel *Sample Report* (Report del campione).

- 11.15.11. Dopo aver inserito tutte le informazioni relative al pozzetto, fare clic su **Save Well** (Salva pozzetto) per salvare. Per cancellare le informazioni relative al contenuto del pozzetto, fare clic su **Clear Well** (Cancella pozzetto).

- 11.15.12. Dopo che un pozzetto viene salvato, il colore di visualizzazione di quel pozzetto cambierà. Il pozzetto sarà visualizzato in rosso fino a quando non sarà stato configurato correttamente, dopodiché diventerà verde (come mostrato di seguito).

NOTA: se corretto, il colore del pozzetto per il controllo di estrazione non diventerà verde fino a quando non ci si passerà sopra con il cursore.

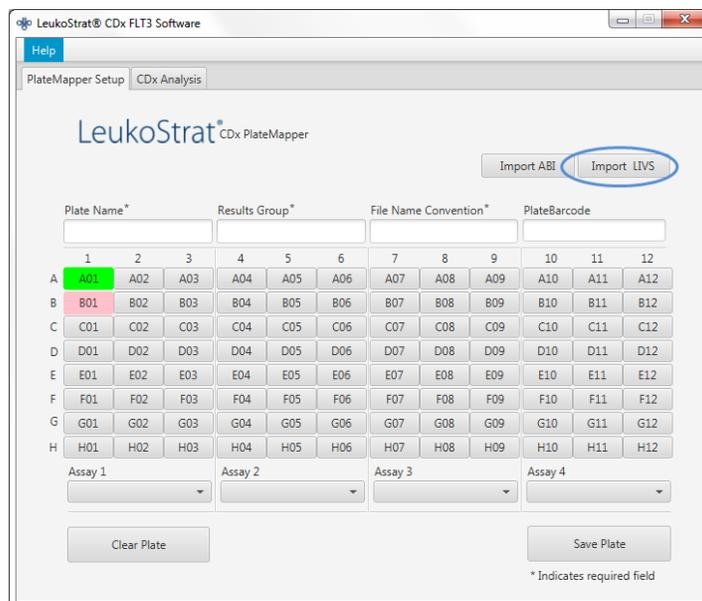
- 11.15.13. Continuare a inserire le informazioni relative a ciascun pozzetto nella schermata *PlateMapper Setup* (Configurazione PlateMapper) fino a quando tutti i pozzetti con le informazioni dei campioni non saranno evidenziati in verde.
- 11.15.14. Dopo aver inserito le informazioni relative a tutti i pozzetti, fare clic su **Save Plate** (Salva piastra); il sistema chiederà all'utente di scegliere una posizione in cui salvare il file ABI (file 3500 Plate Layout versione 1.0) e il file LIVS generati dal software. Per ogni piastra configurata vengono generati un file ABI e un file LIVS.

NOTA: non modificare il file ABI generato dal software LeukoStrat CDx *FLT3* Software. La modifica di tale file determinerà un errore al momento del caricamento sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx.

NOTA: se il software LeukoStrat CDx *FLT3* Software non viene chiuso dopo aver generato la mappa della piastra, gli ID della corsa assegnati automaticamente nei file di output non saranno univoci e si ripeteranno in più corse.

- 11.15.14.1. L'utente può esaminare il file LIVS creato facendo clic su **Import LIVS** (Importa LIVS) e selezionando la posizione in cui il file era stato salvato.

NOTA: la funzione **Import LIVS** (Importa LIVS) serve solo per esaminare la configurazione della piastra. Il file LIVS non può essere modificato per creare una nuova mappa di una piastra da utilizzare per un'altra corsa. Un'operazione di questo tipo genererà un errore.



- 11.15.15. L'utente continuerà a usare il software al termine della corsa sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx.
- 11.15.16. Utilizzare il file ABI generato dal software LeukoStrat CDx *FLT3* Software per caricare la piastra sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx.
- 11.15.17. Se il salvataggio della piastra non riesce, seguire le indicazioni fornite nella Tabella 8. Qualora fosse necessaria ulteriore assistenza, rivolgersi all'Assistenza tecnica Invivoscribe all'indirizzo support@invivoscribe.com.

Tabella 8: Messaggi di errore relativi al salvataggio delle piastre e azioni correttive

Messaggio di errore relativo al salvataggio di una piastra [codice]	Possibile/i causa/e	Azione/i correttiva/e
<ul style="list-style-type: none"> Corrupted sample detected (Rilevato campione danneggiato). [PM01] Could not detect well for object UUID (Impossibile rilevare il pozzetto per l'oggetto UUID). [PM02] Control detected unknown links for well (Il controllo ha rilevato associazioni sconosciute per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM3] 	Tentativo di caricamento di un file LIVS modificato.	Non modificare il file LIVS. Se il file è danneggiato, è necessario creare un nuovo file LIVS.
<ul style="list-style-type: none"> Missing required field "Plate Name" (Campo obbligatorio "Plate Name" [Nome piastra] mancante). [PM04] Illegal character detected in "Plate Name" (Rilevato carattere non consentito nel campo "Plate Name" [Nome piastra]). [PM05] Multiple spaces detected in "Plate Name" (Rilevati spazi multipli nel campo "Plate Name" [Nome piastra]). [PM06] Plate Name must be 50 characters or less (Il nome della piastra può contenere al massimo 50 caratteri). [PM28] 	Le istruzioni fornite per la denominazione di una piastra non sono state seguite.	Il nome della mappa di una piastra può contenere al massimo 50 caratteri alfanumerici (A-Z, a-z, 0-9), spazi singoli e trattini.
<ul style="list-style-type: none"> Missing required field "Results Group" (Campo obbligatorio "Results Group" [Gruppo risultati] mancante). [PM07] 	Le istruzioni fornite per la denominazione di un <i>Result Group</i> (Gruppo risultati) non sono state seguite.	Il <i>Result Group</i> (Gruppo risultati) viene definito sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx.
<ul style="list-style-type: none"> Missing required field "File Name Convention" (Campo obbligatorio "File Name Convention" [Convenzione nome file] mancante). [PM08] 	Le istruzioni fornite per la denominazione di una <i>File Naming Convention</i> (Convenzione di denominazione dei file) non sono state seguite.	La <i>File Naming Convention</i> (Convenzione di denominazione dei file) viene definita sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx.
<ul style="list-style-type: none"> Assay not selected for all samples (Saggio non selezionato per tutti i campioni). [PM09] Run contains more than 1 Assay type (La corsa contiene più di 1 tipo di saggio). [PM10] 	Le istruzioni fornite per l'assegnazione del tipo di saggio non sono state seguite.	A tutti i pozzetti va assegnato un tipo di saggio e una corsa non può contenere più di un tipo di saggio.
<ul style="list-style-type: none"> Sample name not detected for well (Nome del campione non rilevato per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM11] Illegal character detected in Sample Name (Rilevato carattere non consentito nel nome del campione). [PM12] Multiple spaces detected in Sample Name (Rilevati spazi multipli nel nome del campione). [PM13] Sample name must be 50 characters or less (Il nome del campione può contenere al massimo 50 caratteri). [PM14] 	Le istruzioni fornite per la denominazione di un campione non sono state seguite.	Il nome di un campione può contenere al massimo 50 caratteri alfanumerici (A-Z, a-z, 0-9), spazi singoli e trattini.
<ul style="list-style-type: none"> Sample Type not selected for well (Tipo di campione non selezionato per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM15] 	Le istruzioni fornite per la selezione di un tipo di campione non sono state seguite.	A tutti i pozzetti deve essere assegnato un tipo di campione. Le opzioni sono <i>PC</i> , <i>NTC</i> , <i>ECe</i> <i>SAMPLE</i> (CAMPIONE).
<ul style="list-style-type: none"> Run not selected for well (Corsa non selezionata per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM16] No Runs created for Plate (Nessuna corsa creata per la piastra). [PM17] 	Le istruzioni fornite per la selezione delle corse non sono state seguite.	A tutti i pozzetti deve essere assegnata una corsa. L'assegnazione di una corsa al primo pozzetto richiede che l'utente incrementi il numero di corsa (premendo il pulsante "+" accanto alla selezione <i>Run</i> [Corsa]). Per i pozzetti successivi è possibile sia incrementare il numero di corsa che selezionare un numero di corsa usato in precedenza.
<ul style="list-style-type: none"> EC not selected for well (EC non selezionato per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM18] Sample attached to unknown EC for well (Campione associato a un EC sconosciuto per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM19] 	Le istruzioni fornite per l'assegnazione degli EC non sono state seguite.	A tutti i pozzetti <i>SAMPLE</i> (CAMPIONE) deve essere assegnato un EC. Non assegnare un pozzetto di controllo a un EC. A ogni EC deve essere associato almeno un campione.

Tabella 8: Messaggi di errore relativi al salvataggio delle piastre e azioni correttive

Messaggio di errore relativo al salvataggio di una piastra [codice]	Possibile/i causa/e	Azione/i correttiva/e
<ul style="list-style-type: none"> EC selected on control for well (EC selezionato su controllo per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM20] No samples linked to EC for well (Nessun campione associato a EC per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM21] 	Tentativo di caricamento di un file LIVS modificato.	
<ul style="list-style-type: none"> Run missing PC, NTC, EC (PC, NTC, EC mancanti nella corsa). [PM22] Run detected control in sample list (Rilevata la presenza di un controllo nell'elenco dei campioni della corsa). [PM23] Run missing samples (Campioni mancanti nella corsa). [PM24] Run contains more than one (1) assay type (La corsa contiene più di un [1] tipo di saggio). [PM25] 	Le istruzioni fornite per l'assegnazione delle corse non sono state seguite. Tentativo di caricamento di un file LIVS modificato.	Ogni corsa deve contenere un esemplare di ciascun tipo di controllo (PC, NTC, EC). Una corsa deve contenere almeno un pozzetto di tipo <i>SAMPLE</i> (CAMPIONE). Una corsa deve contenere esattamente un tipo di saggio.
<ul style="list-style-type: none"> Too many samples linked to EC for well (Troppi campioni associati all'EC per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM26] EC linked to more than one run for well (EC associato a più di una corsa per il pozzetto) (A-H, 01-12). [PM27] 	Le istruzioni fornite per l'assegnazione degli EC non sono state seguite.	Un singolo EC non può essere associato a più di 11 campioni. Un singolo EC non può essere associato a campioni appartenenti a più di una corsa.

11.16. Configurazione del software dello strumento 3500xL o 3500xL Dx

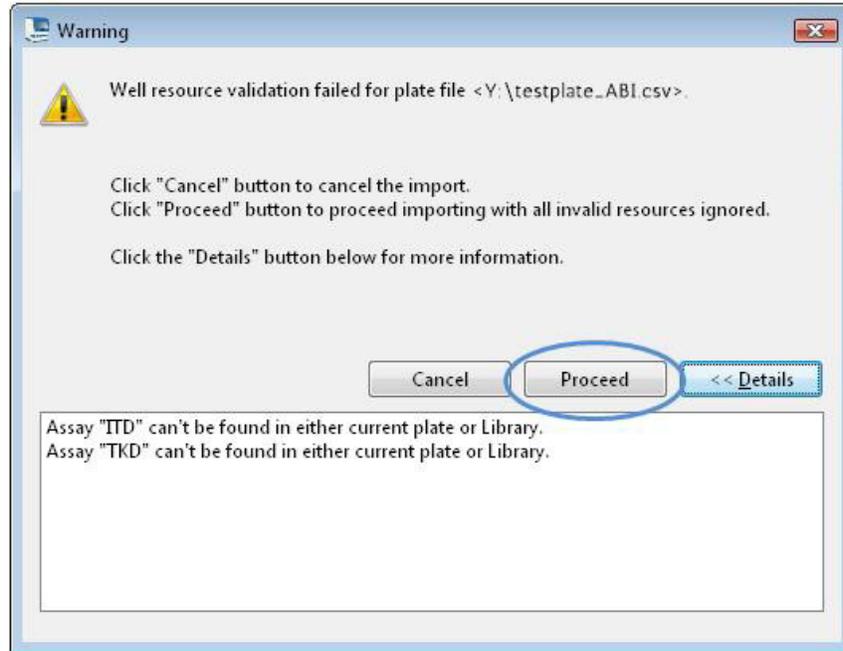
NOTA: il software LeukoStrat CDx *FLT3* Software crea un file da importare sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx (file ABI), che aggiunge informazioni al nome del campione. Il software dello strumento 3500xL o 3500xL Dx può aggiungere altre informazioni.

- 11.16.1. Tutti i passaggi relativi agli strumenti 3500xL e 3500xL Dx, comprese le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione, pulizia e manutenzione, vengono effettuati in base alle istruzioni del produttore, salvo diversamente specificato di seguito.
- 11.16.2. Se il software di raccolta dati non contiene già le impostazioni per il saggio CDx per ITD e per il saggio CDx per TKD, importare i file presenti sul CD del software in dotazione nello strumento ABI 3500xL o nella modalità IVD del software ABI3500xL Dx, a seconda di quanto indicato nella Guida per l'utente dello strumento.

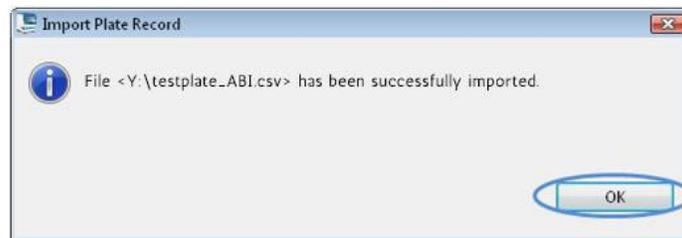
NOTA: il disco del software in dotazione contiene due cartelle con i file .xml: file 3500xL RUO e file 3500xL Dx; selezionare i file appropriati da importare in base allo strumento in cui verranno usati. Il tentativo di importare i file errati in uno degli strumenti potrebbe generare un errore.

NOTA: la presenza di un saggio, una convenzione di denominazione dei file o un gruppo di risultati con lo stesso nome nella modalità RUO e nella modalità IVD del software di raccolta dati dello strumento 3500xL Dx potrebbe generare un errore. Accertarsi che i nomi corrispondenti ai nomi dei file XML forniti non siano già presenti nella modalità RUO del DCS dello strumento 3500xL Dx.

- 11.16.3. Nella schermata del dashboard dello strumento 3500xL o 3500xL Dx, fare clic sul pulsante **Create New Plate** (Crea nuova piastra).
- 11.16.4. Inserire un breve descrittore per il parametro *Plate Name* (Nome piastra).
- 11.16.5. Assicurarsi che il numero di pozzetti sia impostato su *96*.
- 11.16.6. Per il tipo di piastra, selezionare **Fragment** (Frammento) dal menu a discesa.
- 11.16.7. Verificare che la lunghezza dei capillari sia *50 cm* e che il polimero sia *POP7*.
- 11.16.8. Inserire le iniziali dell'operatore nella sezione *Owner* (Proprietario).
- 11.16.9. Fare clic su *Assign Plate Contents* (Assegna contenuto piastra).
- 11.16.10. Fare clic sul pulsante **Import** (Importa) nella parte superiore della schermata; verrà visualizzata una finestra a comparsa. Selezionare il *file da importare nello strumento 3500xL (Dx)* (il file ABI) creato dal software LeukoStrat CDx *FLT3* Software. Nella finestra a comparsa fare clic su **OPEN** (APRI), quindi fare clic su **OK** nella finestra a comparsa di conferma dell'importazione.
- 11.16.10.1. Se nella libreria dello strumento 3500xL o 3500xL Dx non è presente una voce corrispondente al nome del saggio indicato nel file ABI, fare clic su **Proceed** (Continua) nella finestra a comparsa che viene visualizzata:



11.16.11. Fare clic su **OK** nella finestra a comparsa successiva.



11.16.12. Al termine dell'importazione, gli ID campione popoleranno la rappresentazione della disposizione della piastra visualizzata sullo schermo. Verificare che la disposizione della piastra visualizzata sullo schermo sia corretta esaminando gli ID campione sullo schermo. Se i campioni non corrispondono alla configurazione desiderata, occorrerà creare un nuovo file ABI nel software LeukoStrat CDx *FLT3* Software e reimportarlo sullo strumento ABI 3500xL o 3500xL Dx.

NOTA: non modificare gli ID campione sulla mappa delle piastre dello strumento 3500xL o 3500xL Dx. Un'operazione di questo tipo genererà un errore.

11.16.13. Confermare i *saggi* programmati nello strumento 3500xL o 3500xL Dx con i parametri indicati nella Tabella 6 per il saggio **CDx per ITD** o il **saggio CDx per TKD**.

11.16.14. Assegnare i parametri *Assay (Saggio)*, *Results Group (Gruppo risultati)* e *File Name Convention (Convenzione nome file)* a tutti i pozzetti contenenti campioni e controlli, se necessario.

NOTA: *File Name Convention (Convenzione nome file)* deve includere il *Sample Name (Nome campione)* come primo attributo.

11.16.15. Caricare la piastra o le piastre sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx.

11.16.16. Fare clic su **Link Plate for Run** (Associa piastra per corsa). L'operatore può salvare le modifiche alla piastra, se il sistema visualizza il messaggio corrispondente. Se deve essere analizzata una seconda piastra, ripetere i passaggi da 11.16.2 a 11.16.15.

11.17. Esecuzione della corsa con l'analizzatore genetico 3500xL o 3500xL Dx

- 11.17.1. Controllare se sono presenti bollicine nel tubo di POP-7. Rimuovere le bollicine, se necessario.
- 11.17.2. Fare clic su **Start Run** (Avvia corsa) per avviare la corsa sullo strumento 3500xL o 3500xL Dx.
- 11.17.3. Al termine della corsa, rimuovere e gettare via i setti e gettare via la piastra per CE.

NOTA: in caso di un errore di connettività tra lo strumento 3500xL o 3500xL Dx e il computer su cui è installato il software di raccolta dati, seguire le istruzioni di risoluzione dei problemi del produttore dello strumento.

- 11.17.4. Il software GeneMapper può essere utilizzato per analizzare i file come indicato nella sezione *Analisi dei dati con il software GeneMapper* (11.18).

11.18. Analisi dei dati con il software GeneMapper

NOTA: è un requisito utilizzare il software *GeneMapper v6.0 with patch B02* (GM_PeakHeight 202110 patch for GeneMapper™Software Full v6.0). La patch deve essere applicata al software Genemapper; contattare il produttore per ricevere la patch e le istruzioni di installazione.

NOTA: non bypassare un errore relativo allo standard di riferimento per un pozzetto nel software GeneMapper.

- 11.18.1. Assicurarsi di utilizzare *GeneMapper v6.0 with patch B02*.

- 11.18.1.1. Per confermare la versione della patch, aprire *GeneMapper v6.0*. Selezionare la scheda *Help Menu (Menu Guida)* e successivamente **About GeneMapper Software 6 (Informazioni sul Software 6)** Visualizzare il *Build Id (Id build)* sul popup *About (Informazioni)*.

- 11.18.2. Aprire il software *GeneMapper v6.0*.

- 11.18.3. Nel menu *File*, scegliere **New Project** (Nuovo progetto) e selezionare **Microsatellite**. Fare clic su **OK**. Tornare al menu *File* e scegliere **Add Samples to Project** (*Aggiungi campioni al progetto*).

- 11.18.4. Nel riquadro di sinistra, selezionare i file di dati nella cartella dei dati dello strumento 3500xL o 3500xL Dx (specificata dal parametro *Results Group* [Gruppo risultati]) e fare clic su **Add to List** (*Aggiungi a elenco*) per trasferirli nel riquadro di destra. Fare clic sul pulsante **Add** (*Aggiungi*) o **Add & Analyze** (*Aggiungi e analizza*).

- 11.18.5. Verificare che il parametro *Analysis Method* (Metodo di analisi) sia impostato su un metodo **Microsatellite** e che il parametro *Size Standard* (Standard di riferimento) sia impostato su **GS600LIZ+Normalization** (GS600LIZ+normalizzazione) per tutti i campioni.

NOTA: se su una piastra sono presenti più tipi di saggi, le opzioni *Analysis Method* (Metodo di analisi) e *Size Standard* (Standard di riferimento) devono essere impostate in base all'iniezione per facilitare il flusso di lavoro. *Le iniezioni* possono essere selezionate nella finestra *Project* (Progetto).

- 11.18.6. Assicurare che le impostazioni del metodo di analisi siano configurate correttamente. Vedere la Figura 3.

- 11.18.6.1. Fare clic su **Analysis** (Analisi) e poi su **Analysis Method Editor** (Editor metodo di analisi) nel menu visualizzato nella parte superiore della schermata.

- 11.18.6.2. Nella scheda *Peak Detector* (Rilevatore picchi), assicurarsi che il parametro *Peak Detection Algorithm* (Algoritmo di rilevamento picchi) sia impostato su **Advanced** (Avanzato).

- 11.18.6.3. Assicurarsi che nella sezione *Peak Amplitude Thresholds* (Soglie di ampiezza picchi) sia selezionato **100** per **B** (blu) e **G** (verde) e che sia selezionato **50** per i restanti colori **Y** (giallo), **R** (rosso), **P** (viola) e **O** (arancione). I canali dei coloranti giallo e viola non vengono utilizzati per il LeukoStratCDx *FLT3 Mutation Assay*.

- 11.18.6.4. Assicurarsi che il parametro *Polynomial Degree* (Grado polinomio) sia impostato su **3** per ITD e su **5** per TKD.

- 11.18.6.5. Fare clic su **OK** nella parte inferiore della finestra.

NOTA: con il software GeneMapper è possibile impostare e utilizzare metodi di analisi specifici per ITD e TKD andando su *Tools* (Strumenti) e selezionando **GeneMapper Manager** (*Gestione GeneMapper*). Nella scheda *Analysis Methods* (Metodi di analisi) fare clic sul pulsante **New...** (Nuovo...) e selezionare **Microsatellite** come tipo di analisi. Fare clic su **OK**. Nella scheda *General* (Generale), compilare i campi *Name* (Nome), *Description* (Descrizione) e *Instrument* (Strumento), configurare la scheda *Peak Detector* (Rilevatore picchi) come descritto sopra e nella Figura 3, e lasciare le schede *Allele*, *Peak Quality* (Qualità picco) e *Quality Flags* (Indicatori di qualità) con le impostazioni predefinite per *Microsatellite*. Facendo clic su **Done** (Fine), il nuovo metodo di analisi diventa selezionabile.

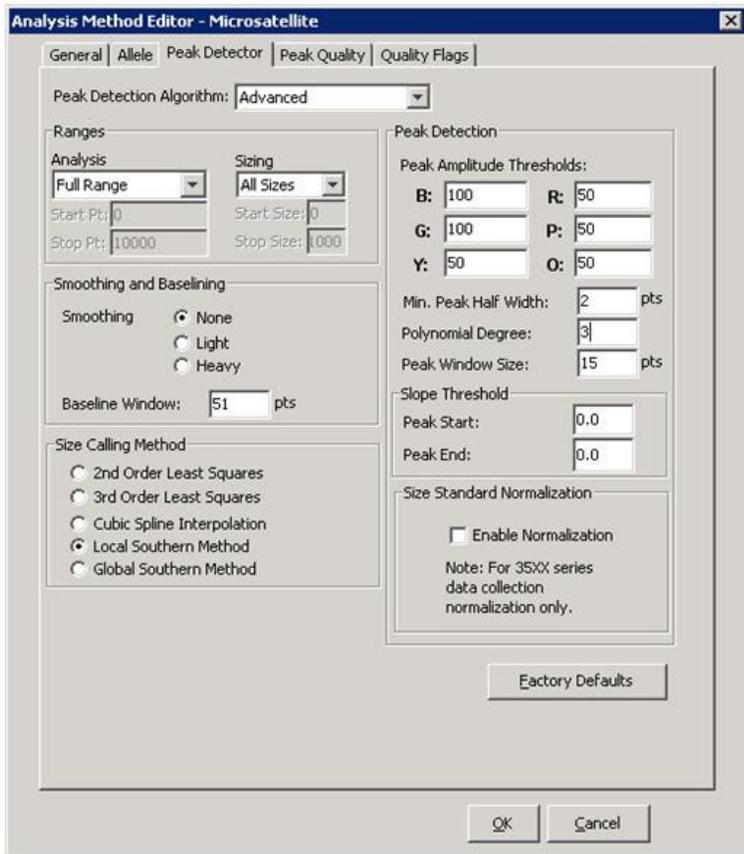


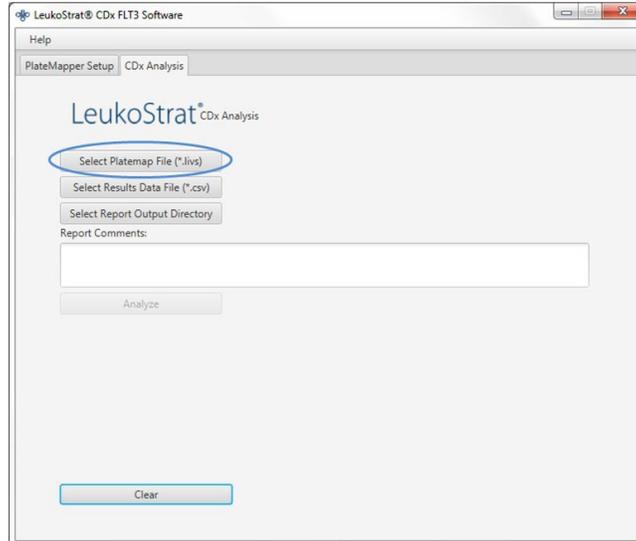
Figura 3. Impostazioni del metodo di analisi per ITD. Per TKD, le impostazioni sono identiche ad eccezione del parametro *Polynomial Degree* (Grado polinomio), che viene impostato su 5.

- 11.18.7. Fare clic sul **pulsante verde di avvio** per avviare l'analisi. Salvare il progetto GeneMapper con un nome appropriato.
- 11.18.8. Nel software GeneMapper evidenziare i campioni e i controlli da analizzare e fare clic sul pulsante **Display Plots** (Visualizza grafici).
 - 11.18.8.1. Per ITD, assicurarsi che l'icona **Sizing Table** (Tabella di dimensionamento) sia selezionata e che nella finestra **Samples Plot** (Grafico campioni) siano selezionati i coloranti blu, verde e rosso.
 - 11.18.8.2. Per ITD, assicurarsi che l'icona **Sizing Table** (Tabella di dimensionamento) sia selezionata e che siano selezionati i coloranti blu e rosso.
- 11.18.9. Assicurarsi che la tabella visualizzata sotto l'elettroferogramma contenga le seguenti colonne: **Dye/Sample Peak** (Picco colorante/campione), **Sample File Name** (Nome file campione), **Size** (Dimensione), **Height** (Altezza) e **Area**.
 - 11.18.9.1. In caso contrario, selezionare **Tools** (Strumenti) e poi **Plot Settings...** (Impostazioni grafico...) nel menu **Samples Plot** (Grafico campioni).
 - 11.18.9.2. Selezionare la scheda **Sizing Table** (Tabella di dimensionamento) e assicurarsi che per le seguenti voci sia presente un contrassegno verde nella colonna **Show** (Mostra): **Dye/Sample Peak** (Picco colorante/campione), **Sample File Name** (Nome file campione), **Size** (Dimensione), **Height** (Altezza) e **Area**.
 - 11.18.9.3. Fare clic su **OK**.
- 11.18.10. Per esportare le informazioni contenute nella tabella di dimensionamento, selezionare **File** e poi **Export Table** (Esporta tabella) nel menu **Samples Plot** (Grafico campioni).
 - 11.18.10.1. Inserire un nome file e selezionare la posizione in cui salvarlo.
 - 11.18.10.2. Nel menu a discesa **Export File As** (Esporta file come) selezionare **Comma-separated values (.csv)** (Valori separati da virgola (.csv)).
 - 11.18.10.3. Fare clic su **Export** (Esporta).

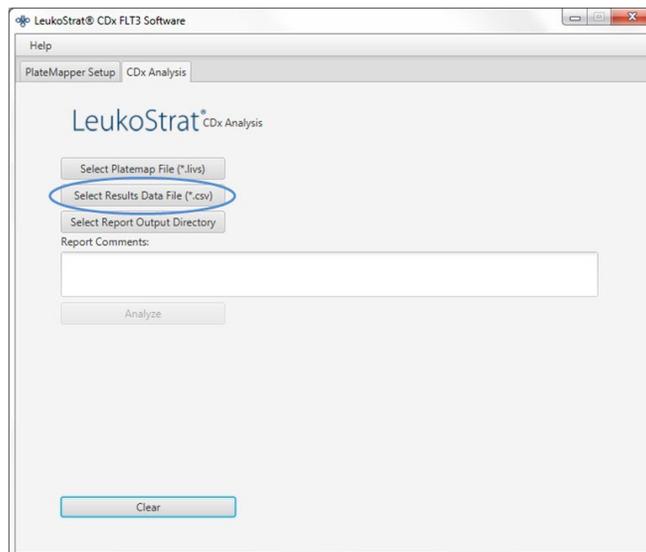
NOTA: non modificare il file CSV in alcun modo.

11.19. Analisi dei dati con il LeukoStrat CDx *FLT3* Software

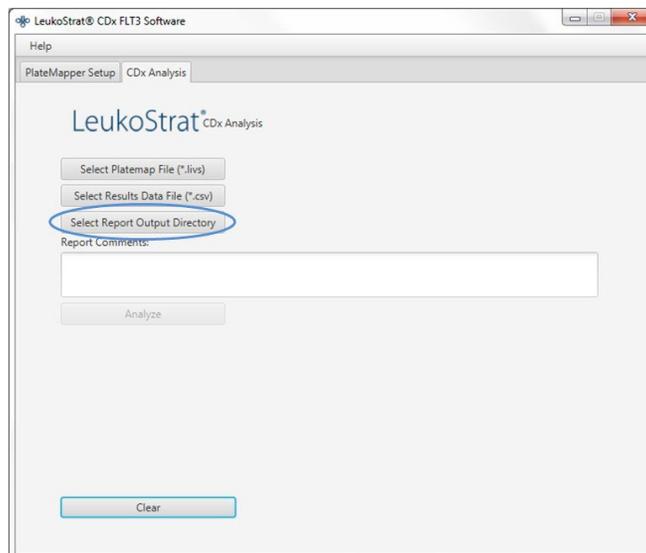
- 11.19.1. Aprire il LeukoStrat CDx *FLT3* Software, accettare l'accordo di licenza e fare clic sulla scheda **CDx Analysis** (Analisi CDx) del LeukoStrat CDx *FLT3* Software.
- 11.19.2. Fare clic su **Select Platemap File (*.livs)** (Seleziona file Platemap [* .livs]) e selezionare il file LIVS generato attraverso la scheda **PlateMapper Setup** (Configurazione PlateMapper).



- 11.19.3. Fare clic su **Select Results Data File (*.csv)** (Seleziona file dei dati dei risultati [*.csv]) e selezionare per l'analisi un file CSV esportato nel passaggio 11.18.10.



- 11.19.4. Fare clic su **Select Results Output Directory** (Seleziona directory di output dei risultati) e scegliere una cartella di destinazione per i risultati.

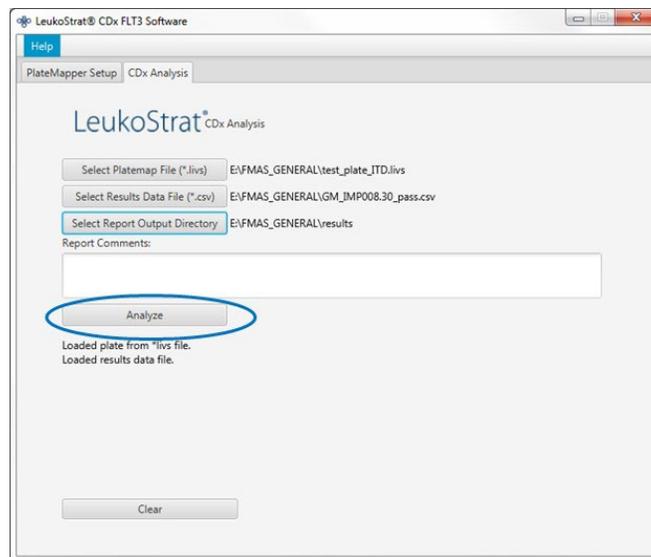


11.19.4.1. Ulteriori commenti sulla corsa, sui campioni o sui controlli possono essere inseriti nel campo *Report Comments* (Commenti sul report). Tali commenti appariranno nel *Run Report* (Report della corsa).

NOTA: dopo aver selezionato tutti i file, non creare o importare una nuova *Plate Map* (Mappa della piastra) nella scheda *PlateMapper Setup* (Configurazione PlateMapper) prima di analizzare la corsa/i dati attuali. Se si apportano modifiche alla scheda *PlateMapper Setup* (Configurazione PlateMapper) prima di selezionare il pulsante **Analyze** (Analizza), nel report verrà visualizzato il *Plate Name* (Nome piastra) errato. Chiudere il software LeukoStrat CDx *FLT3* Software prima di passare dalla scheda *PlateMapper Setup* (Configurazione PlateMapper) e la scheda *CDx Analysis* (Analisi CDx) e viceversa.

11.19.5. Una volta selezionati tutti e tre i file, il pulsante **Analyze** (Analizza) diventerà selezionabile. Fare clic su **Analyze** (Analizza) per generare tre tipi di report nella cartella di destinazione: un *report della corsa in formato PDF*, uno o più *report del campione in formato PDF* e un *file CSV di esportazione della corsa* (vedere la Figura 4, Figura 5 e Figura 6).

- Il *Run Report* (Report della corsa) conterrà un riepilogo dei risultati per tutti i controlli e tutti i campioni.
- Il *Sample Report* (Report del campione) conterrà i risultati relativi ai controlli e i risultati dettagliati relativi al campione.
- Il file *CSV di esportazione della corsa* conterrà tutti i risultati della corsa sotto forma di foglio di calcolo. Gli ID indicati nei report del software LeukoStrat CDx *FLT3* Software corrispondono agli ultimi 12 caratteri dell'ID generato dal 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. Esempio di Run Report (Report della corsa).

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

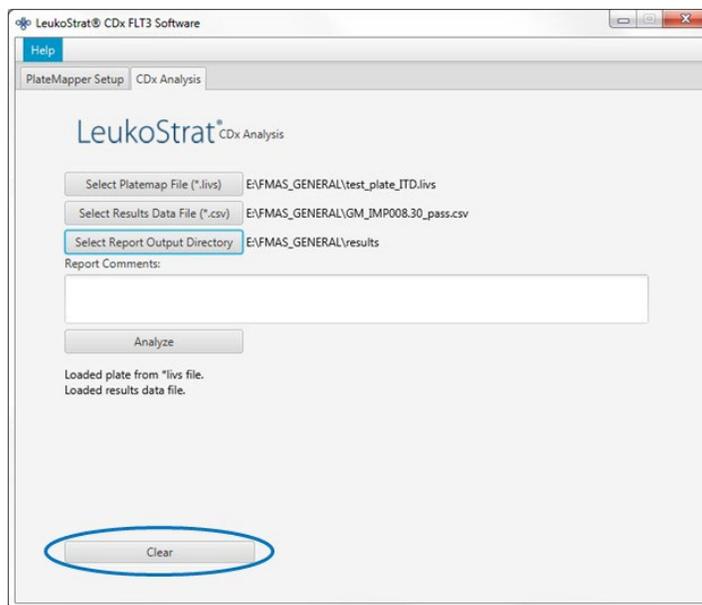
Report Comments
N/A

Figura 5. Esempio di *Sample Report* (Report del campione).

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	F7abf689-888e-4942-8202-08277bd1d48e5	PC		PCControl1_ITD_PC_H01	POS	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	323a17c2-c7bf-4d57-9c86-4a6bf004c2d2	NTC		NTCControl1_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-a028-11f364c3-963	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	NEG	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	21c1a415-6fad-4f69-a78e-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	29533bf-b916-48c9-8ec1-e7444aca2be5	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-4690-92f6-55521e593af6	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-c842fc77b3a	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-db82-4c39-8504-23153e174140	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. Esempio di file CSV di esportazione della corsa

11.19.6. Fare clic su **Clear** (Cancella) per resettare tutti i campi.



11.19.7. Se non si ottengono i risultati, verificare che tutti i passaggi siano stati eseguiti correttamente. Consultare la Tabella 9 per la risoluzione dei problemi relativi a errori nei risultati dei dati. Qualora fosse necessaria ulteriore assistenza, rivolgersi all'Assistenza tecnica Invivoscribe all'indirizzo support@invivoscribe.com.

Tabella 9: Messaggi di errore relativi ai risultati dei dati e azioni correttive

Messaggio di errore relativo al caricamento dei risultati dei dati	Possibile/i causa/e	Azione/i correttiva/e
<ul style="list-style-type: none"> Unrecognized dye (Colorante non riconosciuto): <lettera colorante> [AD01] 	Selezione di coloranti non utilizzati durante la fase di analisi con il software GeneMapper.	Assicurarsi che durante la fase di analisi con il software GeneMapper siano selezionati solo i coloranti Red (Rosso), Green (Verde) e Blue (Blu).
<ul style="list-style-type: none"> No red dye detected. Please make sure red dye is selected during previous signal analysis step (Colorante rosso non rilevato. Assicurarsi che il colorante rosso sia selezionato durante la fase precedente di analisi del segnale). [AD02] 	Durante la fase di analisi con il software GeneMapper non è stato selezionato il colorante rosso.	Accertarsi che durante la fase di analisi con il software GeneMapper sia selezionato il colorante rosso.
<ul style="list-style-type: none"> Unrecognized data results file format (Formato del file dei risultati dei dati non riconosciuto). [AD03] 	Il file del software GeneMapper è danneggiato.	Non modificare il file del software GeneMapper in alcun modo.

Tabella 9: Messaggi di errore relativi ai risultati dei dati e azioni correttive

Messaggio di errore relativo al caricamento dei risultati dei dati	Possibile/i causa/e	Azione/i correttiva/e
<ul style="list-style-type: none"> Unable to load *.livs platemap file; incorrect format (Impossibile caricare il file platemap *.livs; formato errato). [AD04] 	Il file LIVS è danneggiato.	Non modificare il file LIVS in alcun modo.
<ul style="list-style-type: none"> Did not find run for runId (Corsa non trovata per IDcorsa) <IDcorsa> [AD05] Did not find sample for sample name (Campione non trovato per il nome campione) <nomecampione> [AD06] 	Il file LIVS selezionato non è corretto o è danneggiato.	Assicurarsi di selezionare il file LIVS corretto associato all'esperimento analizzato.
<ul style="list-style-type: none"> General error loading results data file; please contact technical support (Errore generale di caricamento del file di dati dei risultati; contattare l'Assistenza tecnica). [AD07] 	Si è verificato un errore sconosciuto.	Contattare l'Assistenza tecnica.
<ul style="list-style-type: none"> String index out of range: -1 (Indice stringa fuori range: -1) 	<Sample Name> (<Nome campione>) non era il primo attributo selezionato durante la configurazione della convenzione di denominazione dei file (passaggio 11.16.14).	Ripetere la corsa dal passaggio 11.12 <i>Rilevamento di elettroforesi capillare</i> con la convenzione di denominazione dei file corretta
<ul style="list-style-type: none"> String index out of range: 15 (Indice stringa fuori range: 15) 	Il file CSV dei risultati è stato modificato.	Ripetere l'esportazione del file CSV dei risultati dal software GeneMapper. Non modificare il file CSV in alcun modo.

12. Controllo di qualità

12.1. Validità della corsa

12.1.1. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Software valuta automaticamente i risultati.

12.1.2. Se lo stato della corsa è *Fail* (Non riuscita), tutti i risultati del test ottenuti nella stessa corsa non saranno validi. A seconda di quanto riportato nella colonna *Fail Detail* (Dettagli mancata riuscita), la corsa dovrà essere ripetuta partendo da punti diversi della procedura del saggio (consultare la sezione 14: *Ripetizione dell'analisi*).

12.2. Validità del controllo di estrazione e dei campioni

12.2.1. Nell'ambito di una corsa valida, singoli campioni potrebbero non essere validi (stato *Fail* [Non riuscito]). Se un controllo di estrazione non soddisfa i criteri di validità, tutti i campioni associati a tale controllo saranno contrassegnati come *Fail* (Non riuscito).

12.2.2. I campioni per i quali tutti i controlli sono validi possono anch'essi essere contrassegnati come non riusciti se individualmente non soddisfano le specifiche. A seconda di quanto riportato nella colonna *Fail Detail* (Dettagli mancata riuscita) nel software LeukoStrat CDx *FLT3* Software, l'analisi del/dei campione/i dovrà essere ripetuta partendo da punti diversi della procedura del saggio (consultare la sezione 14: *Ripetizione dell'analisi*).

NOTA: se in una corsa viene riportato lo stesso tipo di *Fail Detail* (Dettagli mancata riuscita), la strategia di ripetizione della corsa sarà diversa rispetto a quella adottata in caso di mancata riuscita di singoli controlli o campioni (consultare la sezione 14: *Ripetizione dell'analisi*).

13. Interpretazione dei risultati

13.1. Per i pazienti affetti da LMA che presentano una mutazione ITD o TKD di *FLT3* rilevabile con un valore uguale o superiore al valore soglia clinico è indicato il trattamento con gilteritinib fumarato.

13.2. Per i pazienti affetti da LMA che presentano una mutazione ITD di *FLT3* rilevabile con un valore uguale o superiore al valore soglia clinico è indicata la terapia con quizartinib cloridrato. Per i pazienti affetti da LMA che presentano solo una mutazione TKD di *FLT3* rilevabile con un valore uguale o superiore al valore soglia clinico, la terapia con quizartinib cloridrato non è indicata.

13.3. Il rapporto di segnale mutante:wild-type viene calcolato dal software LeukoStrat CDx *FLT3* Software e valutato automaticamente rispetto al valore soglia clinico (punto di decisione medica) di **0,05**. Il rapporto di segnale corrisponde

all'area del picco del segnale del mutante, se presente, divisa per l'area del picco del segnale del wild-type, se presente. Il rapporto di segnale mutante:wild-type viene visualizzato con due cifre decimali.

- 13.4. Va tenuto presente che le mutazioni ITD possono comprendere mutazioni multiple; le aree dei picchi delle mutazioni vengono sommate per calcolare il segnale complessivo del mutante. Inoltre, un campione potrebbe non contenere alcun segnale del wild-type (mutante puro). In questo caso, il rapporto di segnale mutante:wild-type viene riportato dal software LeukoStrat CDx *FLT3* Software come 100, che non ha lo scopo di esprimere un valore del rapporto.
- 13.5. Per la determinazione dello stato mutazione di *FLT3* complessivo o stabilire se il trattamento con gilteritinib fumarato sia indicato:
- 13.5.1 Se il rapporto di segnale mutante:wild-type per ITD o TKD in un campione con risultato valido è uguale o superiore al valore soglia clinico di 0,05, il risultato verrà interpretato e refertato come **Positive** (Positivo); in questo caso è indicato il trattamento con gilteritinib fumarato.
- 13.5.2 Se i rapporti di segnale mutante:wild-type sia per ITD sia per TKD in un campione con risultato valido sono inferiori al valore soglia clinico di 0,05, il risultato verrà interpretato e refertato come **Negative** (Negativo); in questo caso il trattamento con gilteritinib fumarato non è indicato.
- 13.5.3 Lo stato mutazionale di un campione viene definito in base alle regole indicate nella Tabella 10.

Tabella 10: Determinazione dello stato mutazionale dei campioni

Scenario	Risultato del software per ITD	Rapporto di segnale per ITD	Risultato del software per TKD	Rapporto di segnale per TKD	Risultato finale del saggio
1	Positive (Positivo)	≥0,05	Positive (Positivo)	≥0,05	Positive (Positivo)
2	Negative (Negativo)	<0,05	Negative (Negativo)	<0,05	Negative (Negativo)
3	Invalid (Non valido)	N/A	Invalid (Non valido)	N/A	Invalid (Non valido)
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 (Non valido)	N/A	Positive (Positivo)
7	Negative (Negativo)	<0,05	Invalid (Non valido)	N/A	Invalid (Non valido)
8	Invalid (Non valido)	N/A	Positive (Positivo)	≥0,05	Positive (Positivo)
9	Invalid (Non valido)	N/A	Negative (Negativo)	<0,05	Invalid (Non valido)

- 13.6. Per stabilire se il trattamento con quizartinib cloridrato sia indicato:
- 13.6.1 Se il rapporto di segnale mutante:wild-type per ITD in un campione con risultato valido è uguale o superiore al valore soglia clinico di 0,05, il risultato verrà interpretato e refertato come **ITD Positive** (ITD Positivo); in questo caso è indicato il trattamento con quizartinib cloridrato.
- 13.6.2 Se il rapporto di segnale mutante:wild-type per ITD in un campione con risultato valido è inferiore al valore soglia clinico di 0,05, il risultato verrà interpretato e refertato come **ITD Negative** (ITD Negativo); in questo caso il trattamento con quizartinib cloridrato non è indicato.
- 13.6.3 Se il risultato ITD non è valido, il risultato verrà interpretato e refertato come **ITD Invalid** (ITD Non valido); in questo caso il trattamento con quizartinib cloridrato non è indicato.
- 13.7. I dettagli di mancata riuscita sono indicati nel report del software LeukoStrat CDx *FLT3* Software; ripetere la corsa o analizzare nuovamente i campioni in base alle istruzioni fornite nella sezione 14: *Ripetizione dell'analisi*.

14. Ripetizione dell'analisi

14.1. Corse non valide

- 14.1.1. Una corsa in cui il controllo positivo, il controllo senza template o entrambi non soddisfano i criteri di validità è una corsa non valida. Ripetere la corsa includendo tutti campioni, il controllo positivo, tutti i controlli di estrazione associati e il controllo senza template. Le corse ITD e TKD sono indipendenti l'una dall'altra.
- 14.1.2. Ripetere la corsa conformemente a quanto indicato nella Tabella 11 o nella Tabella 12, in base al saggio e ai dettagli di mancata riuscita (Fail Detail) specifici, elencati nella sezione *Controls* (Controlli) dei report del LeukoStrat CDx *FLT3* Software. I dettagli di mancata riuscita elencati per il controllo positivo o il controllo senza template non riusciti prevalgono su tutti quelli indicati per i controlli di estrazione e i campioni.

14.2. Controllo di estrazione non valido nell'ambito di corse valide

- 14.2.1. In caso di mancata riuscita del controllo di estrazione nell'ambito di una corsa valida che potrebbe contenere vari controlli di estrazione, ripetere l'analisi per tutti i controlli di estrazione non riusciti, i campioni associati, il controllo positivo e il controllo senza template per la corsa ITD o TKD appropriata. Ripetere l'analisi conformemente a quanto indicato nella Tabella 11 o nella Tabella 12, in base al saggio e ai dettagli di mancata riuscita (Fail Detail) specifici, elencati nella sezione *Controls* (Controlli) dei report del LeukoStrat CDx *FLT3* Software. I dettagli di mancata riuscita elencati per il controllo di estrazione non riuscito prevalgono su tutti quelli indicati per i campioni.

14.3. Campioni non validi nell'ambito di corse valide

- 14.3.1. In caso di mancata riuscita di uno o più campioni nell'ambito di una corsa valida, ripetere l'analisi del/i campione/i, del controllo positivo, del/i controllo/i di estrazione associato/i al/i campione/i non riuscito/i e del controllo senza template per la corsa ITD o TKD appropriata. Ripetere l'analisi conformemente a quanto indicato nella Tabella 11 o nella Tabella 12, in base al saggio e ai dettagli di mancata riuscita (Fail Detail) specifici, elencati nella sezione *Samples* (Campioni) dei report del LeukoStrat CDx *FLT3* Software. La ripetizione dell'analisi di un campione deve includere la ripetizione dell'analisi del controllo di estrazione associato.

14.4. Dettagli di mancata riuscita e ripetizione dell'analisi

- 14.4.1. Nella Tabella 11 e nella Tabella 12 sono riepilogati i criteri per la ripetizione dell'analisi in base ai dettagli di mancata riuscita (Fail Detail) per tipo di campione, rispettivamente per i saggi ITD e TKD. Consultare la Tabella 13 per i codici di ripetizione dell'analisi riportati nella Tabella 11 e nella Tabella 12.
- 14.4.2. La gerarchia di ripetizione dell'analisi è la seguente:
 - 1) controllo positivo (PC) o controllo senza template (NTC) non validi per ITD o TKD (consultare la sezione 14.1)
 - 2) controllo di estrazione (EC) non valido nell'ambito di una corsa valida (consultare la sezione 14.2)
 - 3) campioni non validi nell'ambito di una corsa valida (consultare la sezione 14.3)

Nella Figura 7 è rappresentato un diagramma della gerarchia di ripetizione dell'analisi.

- 14.4.3. Se si è verificata più di una mancata riuscita per un singolo campione o controllo, procedere alla ripetizione dell'analisi in base al codice che riporta l'operatore al passaggio più vicino all'inizio della procedura del saggio.
 - 14.4.3.1. Se si verifica la stessa modalità di mancata riuscita nello stesso controllo/campione, passare al successivo punto di inizio per la ripetizione dell'analisi, se ne è elencato uno. Se si verifica nuovamente la stessa modalità di mancata riuscita dopo aver completato tutte le azioni di risoluzione dei problemi, il risultato del controllo/campione non è valido.
 - 14.4.3.2. Se i risultati della ripetizione dell'analisi mostrano una modalità di mancata riuscita diversa rispetto ai risultati iniziali, seguire l'azione di risoluzione dei problemi descritta per la nuova modalità di mancata riuscita della ripetizione dell'analisi.

NOTA: non sono consentite più di quattro ripetizioni dell'analisi per ogni singolo controllo/campione.

- 14.4.4. I campioni non validi vengono valutati in maniera indipendente; pertanto, se in una singola corsa vengono identificati più campioni che presentano dettagli di mancata riuscita diversi, occorrerà procedere alla ripetizione dell'analisi iniziando dal passaggio appropriato per ogni campione.

NOTA: qualora fosse necessaria ulteriore assistenza, rivolgersi all'Assistenza tecnica Invivoscribe all'indirizzo support@invivoscribe.com.

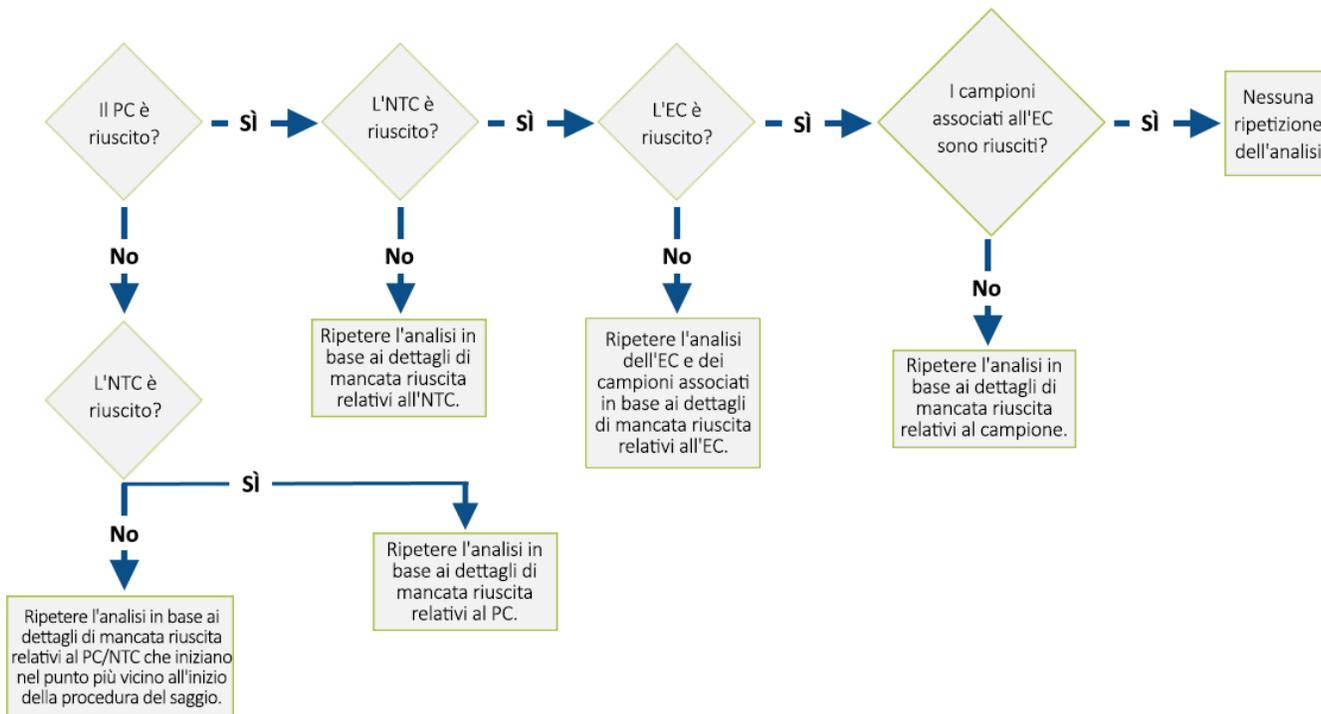


Figura 7. Diagramma della gerarchia di ripetizione dell'analisi

Tabella 11: Ripetizione dell'analisi: controlli e campioni del saggio ITD

Dettagli di mancata riuscita saggio ITD	Controlli			Campione	
	PC	NTC	EC	Campione pos.	Campione neg.
IR05: Campione o controllo non riuscito.	Amp		Amp		Quant/Proc
IR06: Campione o controllo non riuscito.	Amp				Quant/Proc
IR07: Campione non riuscito.				CE-DS	CE-DS
IR09: Campione o controllo non riuscito.	CE	CE	CE	CE/Proc	CE/Proc
IR12: Campione o controllo non riuscito.	Amp		Q-Amp	Quant/Proc	Quant/Proc
IR13: Controllo non riuscito.	CE				
IR20: Controllo non riuscito.				Ctrl	Ctrl
IR21: Controllo non riuscito.				Ctrl	Ctrl
IR31: Controllo non riuscito.	Amp				
IR32: Controllo non riuscito.	CE/Amp				
IR33: Controllo non riuscito.	CE/Amp				
IR34: Controllo non riuscito.	Amp				
IR40: Controllo non riuscito.		Amp			
IR51: Controllo non riuscito.			Q-Amp		
IR52: Controllo non riuscito.			CE/Q-Amp		
IR53: Controllo non riuscito.				Ctrl	Ctrl
IR70: Campione non riuscito.				CE/Proc	

Tabella 11: Ripetizione dell'analisi: controlli e campioni del saggio ITD

Dettagli di mancata riuscita saggio ITD	Controlli			Campione	
	PC	NTC	EC	Campione pos.	Campione neg.
IR80: Campione non riuscito.					Quant/Proc
IR91: Campione o controllo non riuscito.	CE	CE	CE	CE	CE

Tabella 12: Ripetizione dell'analisi: controlli e campioni del saggio TKD

Dettagli di mancata riuscita saggio TKD	Controlli			Campione	
	PC	NTC	EC	Campione pos.	Campione neg.
TR07: Campione o controllo non riuscito.	Dig		Dig		Dig/Proc
TR09: Campione o controllo non riuscito.	CE	CE	CE	CE/Proc	CE/Proc
TR12: Campione o controllo non riuscito.	Amp		Q-Amp	Quant/Proc	Quant/Proc
TR20: Controllo non riuscito.				Ctrl	Ctrl
TR21: Controllo non riuscito.				Ctrl	Ctrl
TR30: Controllo non riuscito.	Xtalk/Amp				
TR31: Controllo non riuscito.	CE/Amp				
TR32: Controllo non riuscito.	CE/Amp				
TR33: Controllo non riuscito.	Amp				
TR40: Controllo non riuscito.		Amp			
TR50: Controllo non riuscito.			Xtalk/Q-Amp		
TR51: Controllo non riuscito.			CE/Q-Amp		
TR52: Controllo non riuscito.			Dig		
TR53: Controllo non riuscito.				Ctrl	Ctrl
TR70: Campione non riuscito.				Xtalk/Quant/Pro	
TR71: Campione non riuscito.				CE/Proc	
TR72: Campione non riuscito.				Dig/Proc	
TR80: Campione non riuscito.					Xtalk/Quant/Proc
TR81: Campione non riuscito.					Quant/Proc
TR93: Campione o controllo non riuscito.	CE	CE	CE	CE	CE

Tabella 13: Codici di ripetizione dell'analisi

Codice di	Descrizione	Punto di inizio per la ripetizione dell'analisi
Amp	Ripetere la procedura iniziando dall'amplificazione, utilizzando le diluizioni del campione di DNA preparate in precedenza.	11.10. <i>Amplificazione</i>
CE	Ripetere la procedura iniziando dall'elettroforesi capillare. Preparare una nuova piastra per CE con amplicone fresco (prelevato dalla piastra di PCR ITD o dalla piastra di digestione TKD conservate) assicurandosi che il controllo positivo, il controllo senza templat e il/i controllo/i di estrazione associato/i siano anch'essi presenti sulla piastra con un campione non riuscito.	11.12. <i>Rilevamento con elettroforesi capillare</i>
CE/Amp CE/Q-Amp	Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni fornite per il codice CE di ripetizione dell'analisi. Se i risultati della ripetizione dell'analisi producono gli stessi dettagli di mancata riuscita, ripetere nuovamente l'analisi seguendo le istruzioni fornite per i codici Amp o Q-Amp, come indicato.	11.12. <i>Rilevamento con elettroforesi capillare</i> 11.9. <i>Quantificazione e diluizione del DNA</i> 11.10. <i>Amplificazione</i>
CE/Proc	Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni fornite per il codice CE di ripetizione dell'analisi. Se i risultati della ripetizione dell'analisi producono gli stessi dettagli di mancata riuscita, processare nuovamente il campione iniziando dal sangue periferico o dall'aspirato midollare.	11.12. <i>Rilevamento con elettroforesi capillare</i> 11.2. <i>Preparazione della processazione dei campioni</i>
CE-DS	Ripetere la procedura iniziando dall'elettroforesi capillare. Preparare una nuova piastra per CE con amplicone fresco (prelevato dalla piastra di PCR ITD conservata) assicurandosi che il controllo positivo, il controllo senza templat e il/i controllo/i di estrazione associato/i siano anch'essi presenti sulla piastra (consultare la sezione 14.6 <i>Variazione di mobilità dovuta al colorante (dye shift)</i>). Se si verifica una seconda volta la stessa modalità di dettagli di mancata riuscita (IR07), refertare il campione come non valido.	11.12. <i>Rilevamento con elettroforesi capillare</i>
Ctrl	Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni fornite per il controllo non riuscito.	Varia
Dig	Ripetere la procedura iniziando dalla digestione, utilizzando amplicone fresco (prelevato dalla piastra di PCR TKD conservata) del/i campione/i, del/i controllo/i di estrazione associato/i e dei controlli.	11.11. <i>Digestione con enzimi di restrizione (solo mutazione TKD)</i>
Dig/Proc	Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni fornite per il codice Dig di ripetizione dell'analisi. Se i risultati della ripetizione dell'analisi producono gli stessi dettagli di mancata riuscita, processare nuovamente il campione iniziando dal sangue periferico o dall'aspirato midollare.	11.11. <i>Digestione con enzimi di restrizione (solo mutazione TKD)</i> 11.2. <i>Preparazione della processazione dei campioni</i>
Q-Amp	Ripetere la procedura iniziando dalla quantificazione del/i controllo/i di estrazione, utilizzando le diluizioni del campione di DNA preparate in precedenza.	11.9. <i>Quantificazione e diluizione del DNA</i> 11.10. <i>Amplificazione (campioni)</i>
Quant	Ripetere la procedura iniziando dalla quantificazione del/i campione/i e del/i controllo/i di estrazione associato/i.	11.9. <i>Quantificazione e diluizione del DNA</i> 11.10. <i>Amplificazione (campioni)</i>
Quant/Proc	Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni fornite per il codice Quant di ripetizione dell'analisi. Se i risultati della ripetizione dell'analisi producono gli stessi dettagli di mancata riuscita, processare nuovamente il campione iniziando dal sangue periferico o dall'aspirato midollare.	11.9. <i>Quantificazione e diluizione del DNA</i> 11.2. <i>Preparazione della processazione dei campioni</i>
Xtalk/Amp Xtalk/Q-Amp Xtalk/Quant/Proc	Preparare una nuova piastra per CE in modo che tutti i campioni siano separati da 5 capillari vuoti (<i>ad es.</i> caricare solo i campioni nei pozzetti A01, C01, E01 e G01 per l'iniezione 1. Caricare i campioni nei pozzetti equivalenti per le iniezioni rimanenti). Se i risultati della ripetizione dell'analisi producono gli stessi dettagli di mancata riuscita, ripetere l'analisi seguendo le istruzioni fornite per i codici Amp, Q-Amp o Quant, come indicato. Se i risultati della ripetizione dell'analisi Quant producono gli stessi dettagli di mancata riuscita, processare nuovamente il campione iniziando dal sangue periferico o dall'aspirato midollare.	11.12. <i>Rilevamento con elettroforesi capillare</i> 11.9. <i>Quantificazione e diluizione del DNA (controllo/i di estrazione)</i> 11.10. <i>Amplificazione (campioni, PC)</i> 11.2. <i>Preparazione della processazione dei campioni</i>

14.5. Mancata riuscita di più pozzetti nell'ambito di una corsa

- 14.5.1. A differenza dei casi di risultati non validi per singoli campioni o controlli, alcuni dettagli di mancata riuscita possono essere osservati per svariati o tutti i pozzetti di reazione. Quando si verifica questo tipo di mancata riuscita, ripetere la corsa includendo tutti i campioni, il controllo positivo, tutti i controlli di estrazione associati e il controllo senza templat in base a quanto riportato nella Tabella 14; i codici di ripetizione dell'analisi sono elencati nella Tabella 15.

14.5.2. Ulteriori azioni per la risoluzione dei problemi possono includere quanto segue.

- 14.5.2.1. Aprire il file CSV per confermare che contenga i risultati di tutti i pozzetti dei campioni e dei controlli a cui è associato un file FSA dello strumento 3500xL o 3500xL Dx.
- 14.5.2.2. Nel file CSV, assicurarsi che siano presenti le colonne corrette, che i valori soglia dei picchi siano corretti (*ovvero* nessun picco inferiore a 100 per il blu e il verde o inferiore a 50 per il rosso) e che le colonne siano popolate con numeri diversi da zero.

Tabella 14: Ripetizione dell'analisi: mancata riuscita di più pozzetti nell'ambito di una corsa

Tipo di campione	Fail Detail (Dettagli mancata riuscita)	Codice di ripetizione dell'analisi
PC ITD	IR31	Amp
NTC ITD	IR40	
EC ITD	IR51	
PC TKD	TR30	
NTC TKD	TR40	
EC TKD	TR50	
PC ITD	IR33	CE/Amp
Campione ITD	IR70	
PC TKD	TR32	
Campione TKD	TR71	
PC ITD	IR32	
EC ITD	IR52	
Campione ITD	IR80	
PC TKD	TR31	
EC TKD	TR51	CE-SS
Campione TKD	TR81	
Tutti gli ITD nell'ambito di un'iniezione	IR91	GM
Tutti i TKD nell'ambito di un'iniezione	TR93	
Tutti gli ITD nell'ambito di una corsa	IR04	GM
Tutti i TKD nell'ambito di una corsa	TR04	

Tabella 15: Codici di ripetizione dell'analisi: ripetizione dell'analisi in caso di mancata riuscita di più pozzetti

Codice di ripetizione dell'analisi	Descrizione	Punto di inizio per la ripetizione dell'analisi
Amp	Ripetere la procedura iniziando dall'amplificazione e utilizzando le diluizioni di DNA dei campioni preparate in precedenza. Accertarsi che tutte le provette vengano passate al vortex seguendo le istruzioni e che sia stata aggiunta la Taq.	11.10. <i>Amplificazione</i>
CE	Ripetere la procedura iniziando dall'elettroforesi capillare. Preparare una nuova piastra per CE con amplicone fresco (prelevato dalla piastra di PCR ITD o dalla piastra di digestione TKD conservate) e soluzione di standard di riferimento fresca. Assicurarsi che il controllo positivo, il controllo senza template e il/i controllo/i di estrazione associato/i siano anch'essi presenti sulla piastra con il campione non riuscito.	11.12. <i>Rilevamento con elettroforesi capillare</i>
GM	Ripetere la creazione dei file di dati da esportare dal software GeneMapper, assicurandosi che la soglia o le soglie siano impostate su 100 RFU.	11.18 <i>Analisi dei dati con il software GeneMapper</i>
CE/Amp	Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni fornite per il codice CE di ripetizione dell'analisi. Se i risultati della ripetizione dell'analisi producono gli stessi dettagli di mancata riuscita, ripetere nuovamente l'analisi seguendo le istruzioni fornite per i codici Amp.	11.12. <i>Rilevamento con elettroforesi capillare</i> 11.10. <i>Amplificazione</i>
CE-SS	Ripetere la procedura iniziando dall'elettroforesi capillare, utilizzando una nuova preparazione della soluzione di standard di riferimento.	11.12. <i>Rilevamento con elettroforesi capillare</i>

14.6. Variazione di mobilità dovuta al colorante (dye shift)

In rari casi, con alcuni grossi inserti nel saggio ITD, il software LeukoStrat CDx *FLT3* Software può compiere errori di identificazione nella conferma di un picco mutante. Per confermare la variazione di mobilità dovuta al colorante, ripetere l'elettroforesi capillare preparando una nuova piastra per CE con amplicone fresco prelevato dalla piastra di PCR ITD conservata.

15. Limiti della procedura

- 15.1. Analizzare solo i tipi di campioni indicati, poiché il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è stato validato per l'uso solo con sangue periferico e aspirato midollare. L'affidabilità dei risultati dipende da una corretta conservazione e processazione dei campioni; pertanto, seguire le procedure indicate nelle presenti Istruzioni per l'uso.
- 15.2. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è stato validato utilizzando esclusivamente il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit per l'estrazione del DNA genomico.
- 15.3. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è in grado di rilevare mutazioni ITD di dimensioni comprese fra 3 bp e 323 bp; tuttavia, il saggio è stato validato soltanto per il rilevamento di mutazioni di dimensioni comprese fra 30 bp e 279 bp.
 - Le inserzioni ITD di dimensioni comprese fra 3 bp e 30 bp saranno refertate come mutazioni ITD.
 - Le inserzioni ITD di dimensioni comprese fra 279 bp e 323 bp saranno refertate come mutazioni ITD.
 - Le inserzioni ITD di dimensioni superiori a 323 bp non sono rilevabili dal saggio.
- 15.4. Il saggio potrebbe non rilevare mutazioni di *FLT3* al di sotto del suo livello di sensibilità.
 - 15.4.1. Per le inserzioni ITD di dimensioni comprese fra 30 bp e 126 bp, incluse, un rapporto allelico pari a 0,08 produrrà un risultato positivo con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
 - 15.4.2. Per le inserzioni ITD di dimensioni comprese fra 129 bp e 279 bp, incluse, un rapporto allelico pari a 1 produrrà un risultato positivo con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
 - 15.4.3. Per le mutazioni TKD che modificano il sito EcoRV, un rapporto allelico pari a 0,18 produrrà un risultato positivo con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 15.5. Questo saggio presenta tassi diversi di variabilità del rapporto di segnale in base al tipo di mutazione *FLT3* mostrato di seguito.
 - 15.5.1. Per le inserzioni ITD di dimensione tra 21 bp e 90 bp (incluse), la variabilità del rapporto di segnale è compresa tra 4,4% e 8,5%.
 - 15.5.2. Per le inserzioni ITD di dimensione pari a 217 bp, la variabilità del rapporto di segnale è compresa tra 26,9% e 27,2%.
 - 15.5.3. Per le mutazioni TKD che modificano il sito EcoRV, la variabilità del rapporto di segnale è compresa tra 4,2% e 5,9%.
- 15.6. I risultati del saggio devono sempre essere interpretati nel contesto dei dati clinici e di altri esami eseguiti sui pazienti.
- 15.7. Le prestazioni cliniche del test determinate utilizzando i dati ottenuti con lo studio di accuratezza clinica sono:
 - 15.7.1. Sensibilità diagnostica: 1
 - 15.7.2. Specificità diagnostica: 0,92
 - 15.7.3. Rapporto di probabilità di risultato positivo: 12,5
 - 15.7.4. Rapporto di probabilità di risultato negativo: 0
- 15.8. Il rilevamento di una mutazione dipende dal numero di copie della sequenza mutante presenti nel campione e può essere influenzato dall'integrità del campione, dalla quantità di DNA isolato e dalla presenza di sostanze interferenti. I saggi basati su PCR sono soggetti a interferenze dovute alla degradazione del DNA o all'inibizione della PCR a causa della possibile presenza di EDTA e altri agenti.
- 15.9. Questo prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale addestrato nelle tecniche di PCR e nell'uso del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 15.10. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è un test qualitativo. Il test non è destinato a misurazioni quantitative delle mutazioni ITD o TKD.
- 15.11. Il rapporto allelico di un campione non può essere calcolato, misurato o determinato mediante questo saggio.

16. Valori attesi

16.1. Dimensioni attese dei prodotti amplificati

- 16.1.1. Le dimensioni degli ampliconi indicate sono state determinate utilizzando uno strumento 3500xL e uno strumento 3500xL Dx (Tabella 16).

NOTA: “canale colorante“ indica il colore dei prodotti generati con la master mix quando si utilizza l’assegnazione dei colori predefinita sui sistemi di rilevamento della fluorescenza ABI.

Tabella 16: Dimensioni attese degli ampliconi

Master mix	N. di cat.	Bersaglio	Canale colorante	DNA di controllo	Dimensioni del prodotto in nucleotidi
<i>FLT3</i> ITD	R0880060 R0880080	Esone 14 e 15	Blu e verde	Range di dimensioni valide DNA di controllo positivo <i>FLT3 ITD</i> DNA di controllo di estrazione <i>FLT3</i>	326-650 327±1, 357±1 327±1
<i>FLT3</i> TKD	R0880070 R0880080	Esone 20	Blu	Range di dimensioni valide DNA di controllo positivo <i>FLT3 TKD</i> DNA di controllo di estrazione <i>FLT3</i>	78-80, 124-128 79±1, 127±1 79±1, 127±1 ^a

^a**Nota:** nel controllo di estrazione potrebbe essere presente o meno un piccolo picco di prodotto di 127 bp.

17. Valutazione delle prestazioni non cliniche

17.1. Sensibilità analitica – Limite del bianco (LoB)

Quando i campioni contenenti solo DNA wild-type (*ad es.* utilizzando un bianco per il mutante) sono stati analizzati con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, il valore di SR è stato 0,00 per il saggio ITD e compreso tra 0,00 e 0,01 per il saggio TKD. Questo limite del bianco è notevolmente inferiore all’SR di 0,05 utilizzato come valore soglia clinico.

17.2. Sensibilità analitica

17.2.1. Il limite di rilevamento (LoD) del saggio è stato valutato in due studi. Nel primo studio sono stati utilizzati campioni preparati artificialmente combinando linee cellulari con sangue intero privato dei leucociti. I campioni di linee cellulari sono stati utilizzati per rappresentare inserti ITD di quattro dimensioni: un inserto di 21 bp, un inserto di 30 bp, un inserto di 126 bp e un inserto di 279 bp. È stata inoltre valutata una linea cellulare supplementare contenente la mutazione D835. Il DNA è stato diluito a 5 ng/μL, 10 ng/μL e 15 ng/μL e analizzato con più rapporti allelici per ogni linea cellulare. È stato condotto un secondo studio con campioni clinici per confermare le osservazioni sul LoD ottenute con le linee cellulari. Cinque campioni clinici sono stati diluiti con campioni clinici negativi allo scopo di ottenere un rapporto di segnale mirato (TSR) nell’ambito del range lineare di uno standard di linea cellulare appropriata (Tabella 17). Ogni campione è stato diluito a 5 livelli rappresentanti un valore basso negativo (LN), alto negativo (HN), prossimo al valore soglia (CO), basso positivo (LP) e moderato positivo (MP). Tali campioni con range lineare sono stati analizzati con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay ed è stato determinato un valore SR medio. Ogni diluizione del campione al LoD clinico è stata analizzata 20 volte per ogni livello di diluizione nel corso di 4 giorni non consecutivi (5 replicati al giorno) da un unico operatore che ha utilizzato le stesse apparecchiature. L’AR di ciascuna diluizione del campione al LoD clinico è stato calcolato utilizzando l’AR stimato dalle curve standard delle linee cellulari. Gli AR dei campioni al LoD clinico sono stati stimati sulla base del fatto che lo studio soddisfacesse i seguenti criteri di accettazione:

- SR e AR in corrispondenza dei quali le mutazioni di *FLT3* possono essere rilevate al di sopra del limite del bianco (LoB) in ≥95% dei replicati (LoD analitico).
- AR prossimo al valore soglia clinico, corrispondente a un SR pari a 0,04 - 0,06 (valore soglia).
- AR e SR rilevati pari o al di sopra del valore soglia clinico in ≥95% dei replicati (superiore al valore soglia).

Tabella 17: SR, AR e LoD per ogni campione e livello di diluizione

Sample ID (ID campione)	Mutazione	Livello	TSR	Media SR	AR della combinazione	N. valido	N. (%) SR > LoB	N. (%) SR ≥ 0,05	*Classificazione
TKD CS1	TKD I836	LN	0,02	0,02	0,039	20	20 (100,0)	0	LoD analitico
		HN	0,03	0,03	0,057	20	20 (100,0)	0	-
		CO	0,05	0,05	0,094	20	20 (100,0)	16 (80,0%)	Valore soglia
		LP	0,08	0,07	0,144	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Superiore al valore soglia
		MP	0,13	0,12	0,224	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
TKD CS2	TKD D835	LN	0,01	0,02	0,023	20	20 (100,0)	0	LoD analitico
		HN	0,02	0,03	0,047	20	20 (100,0)	0	-
		CO	0,04	0,05	0,089	20	20 (100,0)	19 (95,0)	Valore soglia Superiore al valore soglia
		LP	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)	-
ITD CS1	ITD 24 bp	LN	0,02	0,02	0,044	20	20 (100,0)	0	LoD analitico
		HN	0,03	0,03	0,065	20	20 (100,0)	0	-
		CO	0,05	0,05	0,107	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Valore soglia Superiore al valore soglia
		LP	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)	-
ITS-CS2	ITD 66 bp	LN	0,02	0,02	0,045	20	20 (100,0)	0	LoD analitico
		HN	0,03	0,03	0,066	20	20 (100,0)	0	-
		CO	0,05	0,05	0,110	20	20 (100,0)	18 (90,0)	Valore soglia
		LP	0,09	0,08	0,189	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Superiore al valore soglia
		MP	0,14	0,13	0,280	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
ITD CS3	ITD 217 bp	LN	0,01	0	0,073	20	2 (10,0)	0	-
		HN	0,02	0,02	0,147	20	15 (75,0)	0	-
		CO	0,04	0,04	0,276	20	20 (100,0)	9 (45,0)	LoD analitico Valore soglia
		LP	0,08	0,08	0,539	20	19 (95,0)	19 (95,0)	Superiore al valore soglia
		MP	0,13	0,13	0,838	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
ITD vero neg.	Nessuna	TN	N/A	0	0	20	0	0	N/A
TKD vero neg.	Nessuna	TN	N/A	0	0	20	0	0	N/A

*Le classificazioni sono definite come: 1) LoD analitico = l'AR più basso in corrispondenza del quale i campioni sono stati rilevati il 95% delle volte al di sopra del LoB; 2) valore soglia = l'AR in corrispondenza del quale i campioni erano prossimi al valore di SR di 0,05; e 3) superiore al valore soglia = l'AR più basso in corrispondenza del quale il 95% delle volte i campioni potevano essere rilevati a un valore pari oppure pari o al di sopra del valore di SR di 0,05.

17.2.2. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è in grado di rilevare i seguenti rapporti allelici mutante/wild-type al di sopra del valore soglia clinico dei seguenti tipi di mutazioni:

- 17.2.2.1. Per le inserzioni ITD di dimensioni pari a 24 bp, un rapporto allelico di 0,107 è stato rilevato al di sopra del valore soglia di SR in oltre il 95% dei campioni. Il %CV dell'SR per questi campioni era pari a 7,1%.
- 17.2.2.2. Per le inserzioni ITD di dimensioni pari a 66 bp, un rapporto allelico di 0,189 è stato rilevato al di sopra del valore soglia di SR in più del 95% dei campioni. Il %CV dell'SR per questi campioni era pari a 7,1%.
- 17.2.2.3. Per le inserzioni ITD di dimensioni pari a 217 bp, un rapporto allelico di 0,539 è stato rilevato al di sopra del valore soglia di SR in più del 95% dei campioni. Il %CV dell'SR per questi campioni era pari a 25,6%.
- 17.2.2.4. Per le mutazioni TKD D835 che distruggono il sito EcoRV, un rapporto allelico di 0,089 è stato rilevato al di sopra del valore soglia di SR in più del 95% dei campioni. Il %CV dell'SR per questi campioni era pari a 4,5%.
- 17.2.2.5. Per le mutazioni TKD I836 che distruggono il sito EcoRV, un rapporto allelico di 0,144 è stato rilevato al di sopra del valore soglia di SR in più del 95% dei campioni. Il %CV dell'SR per questi campioni era pari a 5,7%.
- 17.2.2.6. La conversione dei valori di AR in % mutante è indicata nella tabella qui di seguito.

Tabella 18: Sensibilità analitica, rapporto allelico e % mutante

Sample ID (ID campione)	Mutazione	Classificazione della mutazione	Superiore al valore soglia 95% SR $\geq 0,05$		
			AR	SR	% mut.
TKD CS1	TKD I836	Delezione TKD I836	0,144	0,07	12,6
TKD CS2	TKD D835	Sostituzione TKD D835	0,089	0,05	8,2
ITD CS1	ITD 24 bp	Inserito ITD piccolo <30 bp	0,107	0,05	9,7
ITD CS2	ITD 66 bp	Inserito ITD medio 30-100 bp	0,189	0,08	15,9
ITD CS3	ITD 217 bp	Inserito ITD grande ~200 bp	0,539	0,08	35,0

17.3. Precisione

- 17.3.1. La precisione del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è stata determinata da tre operatori che hanno analizzato separatamente 10 replicati ciascuno di campioni con mutazioni ITD con inserti di dimensioni comprese tra 21 bp e 126 bp e campioni con mutazioni TKD. I 10 replicati sono stati analizzati in gruppi di due, in un totale di cinque momenti diversi.
- 17.3.2. Per i campioni con mutazioni ITD, gli intervalli dei %CV dell'SR per i tre operatori sono risultati compresi tra 7,4% e 15,0%, tra 3,7% e 13,0% e tra 4,2% e 8,8%.
- 17.3.3. Per i campioni con mutazioni TKD, gli intervalli dei %CV dell'SR per i tre operatori sono risultati compresi tra 6,3% e 11,2%, tra 5,8% e 9,3% e tra 5,5% e 8,3%.

17.4. Riproducibilità inter-operatore (linee cellulari)

- 17.4.1. I campioni erano costituiti da linee cellulari con ITD contenenti inserti di 21 bp, 30 bp e 126 bp e la mutazione TKD D835. I campioni erano caratterizzati da SR mutante:wild-type bassi (prossimi al valore soglia), medi e alti (linea cellulare mutante al 100%) per piccole duplicazioni tandem interne (ITD), grandi inserti ITD e mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD). Tre operatori, che hanno utilizzato un singolo lotto di reagente e un singolo strumento per 15 corse, hanno analizzato 10 replicati ciascuno. I valori di %CV dell'SR sono risultati compresi tra 6,6% e 13,3%.
- 17.4.2. Per i campioni con mutazioni TKD, il %CV dell'SR è risultato compreso tra 7,9% e 9,3%.
- 17.4.3. Per i campioni con mutazioni ITD con inserti fino a 30 bp (compresi), il %CV dell'SR è risultato compreso tra 6,6% e 9,4%.
- 17.4.4. Per i campioni con mutazioni ITD con inserti da 126 bp, il %CV dell'SR è risultato compreso tra 9,0% e 13,3%.

17.5. Riproducibilità inter-operatore (campioni clinici)

- 17.5.1. In un secondo studio, la precisione è stata valutata utilizzando campioni di DNA ottenuto da 7 campioni clinici (5 di sangue periferico e 2 di aspirato midollare) con lunghezza degli inserti ITD pari a 21 bp, 24 bp, 66 bp, 90 bp e 217 bp, una sostituzione TKD D835, una delezione TKD I836 e 8 campioni (4 di sangue periferico e 4 di aspirato midollare) negativi per le mutazioni di *FLT3*. Il DNA ottenuto dai campioni clinici negativi per le mutazioni di *FLT3* è stato raggruppato in pool e utilizzato per diluire i campioni positivi per le mutazioni di *FLT3* allo scopo di ottenere tre livelli di SR target prossimi al valore soglia clinico del saggio (ovvero alto negativo, basso positivo e moderato positivo). Cinque campioni clinici positivi per le mutazioni di *FLT3* derivavano da sangue periferico e due da aspirato midollare. Tre replicati di 5 campioni ITD positivi, 2 campioni TKD positivi e un campione vero negativo raggruppato in pool sono stati analizzati da tre operatori/set di strumenti diversi utilizzando 1 lotto di reagente nel corso di cinque giorni non consecutivi a tre livelli di diluizione per i campioni positivi e senza eseguire diluizioni per il campione negativo. Ciascun operatore ha analizzato in tutto 15 replicati per livello, per un totale di 45 replicati per livello di diluizione.
- 17.5.2. Il %CV totale per tutti i tipi di mutazioni e livelli è indicato nella Tabella 19 qui di seguito e il %CV per tutti i tipi di mutazioni, ad eccezione del campione con inserto ITD lungo (217 bp), è risultato compreso tra 4,2% e 16,1%. Per il campione con una mutazione di 217 bp, il %CV è risultato compreso tra 26,9% e 27,2%. Il %CV del livello di diluizione basso positivo (LP) era di 26,9% per l'inserto di 217 bp, non ha quindi soddisfatto i criteri di accettazione dello studio fissati a un valore $\leq 25\%$ CV per l'SR. I risultati mostrano che i criteri di accettazione sono stati soddisfatti per entrambe le mutazioni TKD (D835 e I836) e per le mutazioni ITD fino a 217 bp. La variabilità per la mutazione ITD di 217 bp ha superato il 25%, indicando una maggiore imprecisione per gli inserti ITD più grandi.

Tabella 19: Componenti della varianza per tipo di mutazione e livello di diluizione

Sample ID (ID campione)	Tipo di mut.	Livello di diluizione	SR medio	Variabilità SR dovuta a			Variabilità totale	
				Operatore/ Strumento DS (%)	Giorno di analisi DS (%)	Errore random DS (%)	DS	%CV
S1	TKD I836	HN	0,03	0,000 (3,22%)	0,000 (0,00%)	0,002 (96,78%)	0,002	7,1
		LP	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	TKD D835	HN	0,04	0,001 (7,13%)	0,000 (0,00%)	0,002 (92,87%)	0,002	5,3
		LP	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	ITD 21 bp	HN	0,03	0,000 (0,00%)	0,000 (0,00%)	0,001 (100,0%)	0,001	5
		LP	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	ITD 24 bp	HN	0,029	0,000 (0,00%)	0,000 (0,00%)	0,004 (100,0%)	0,004	15,2
		LP	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	ITD 66 bp	HN	0,029	0,001 (4,28%)	0,000 (0,00%)	0,005 (95,72%)	0,005	16,1
		LP	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	ITD 90 bp	HN	0,03	0,001 (5,15%)	0,000 (0,00%)	0,003 (94,85%)	0,003	10,1
		LP	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	ITD 217 bp	HN	0,032	0,001 (0,90%)	0,002 (7,20%)	0,008 (91,90%)	0,009	27,2
		LP	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

17.6. Riproducibilità inter-lotto e inter-strumento

- 17.6.1. La riproducibilità inter-lotto e inter-strumento è stata determinata da un unico operatore che ha analizzato lo stesso set di campioni utilizzando tre lotti di reagenti su tre set di strumenti. I campioni di linee cellulari erano costituiti da campioni ITD contenenti inserti di dimensioni comprese fra 21 bp e 126 bp e campioni con mutazioni TKD.
- 17.6.2. Per i campioni con mutazioni ITD, il %CV dell'SR è risultato compreso tra 3,0% e 8,4%.
- 17.6.3. Per i campioni con mutazioni TKD, il %CV dell'SR è risultato compreso tra 5,4% e 10,6%.

17.7. Sostanze interferenti - Esogene

- 17.7.1. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è in grado di rilevare mutazioni ITD di dimensioni comprese tra 18 bp e 114 bp e mutazioni TKD in presenza di eparina sodica e del tampone di lavaggio utilizzato durante il processo di isolamento del DNA.

17.8. Sostanze interferenti - Endogene

- 17.8.1. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è in grado di rilevare mutazioni ITD di dimensioni comprese tra 18 bp e 114 bp e mutazioni TKD in presenza di lipidi/trigliceridi, emoglobina, proteine e bilirubina.

17.9. Sostanze interferenti - Trattamenti farmacologici

- 17.9.1. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è in grado di rilevare mutazioni ITD di dimensioni comprese tra 18 bp e 114 bp e mutazioni TKD in presenza di citarabina e daunorubicina.

17.10. Carry-over e contaminazione crociata

- 17.10.1. Quando testato con le tipiche configurazioni a scacchiera della mappa della piastra, il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay ha dimostrato che il carry-over e la contaminazione crociata non rappresentavano un problema:
- 17.10.1.1. il carry-over/la contaminazione crociata rilevati sono risultati pari a 0%;
 - 17.10.1.2. il tasso di controlli senza template per ITD e TKD non riusciti è risultato pari a 0%.

17.11. Input di DNA

- 17.11.1. Questo studio aveva lo scopo di ottenere dati che dimostrassero l'equivalenza in caso di input di DNA a una concentrazione di 10 ± 3 ng/ μ L nel saggio. Sono stati utilizzati replicati di DNA estratto adoperati nello studio sul limite di rilevamento e sul range dinamico con campioni preparati artificialmente, analizzando esclusivamente i membri del pannello di campioni con il rapporto allelico più basso. I campioni di DNA indicati di seguito sono stati diluiti a 7, 10 e 13 ng/ μ L e analizzati con il saggio insieme a un singolo replicato di controllo negativo.
- ITD 30 bp con AR 0,03 (33 replicati per ogni livello di input di DNA)
 - TKD D835 con AR 0,05 (33 replicati)
 - ITD 126 bp con AR 0,05 (22 replicati)
 - ITD 279 bp con AR 1 (11 replicati)
- 17.11.2. I criteri di accettazione sono stati soddisfatti per ITD 30 bp, ITD 126 bp e campioni di linee cellulari TKD D835: 1) >93,9% dei replicati ha soddisfatto i criteri di validità del campione per ogni tipo di campione e input di DNA; 2) il coefficiente di variazione complessivo (CV) è risultato <20,5% per ogni tipo di campione; e 3) il CV è stato <21,0% per ogni tipo di campione quando i replicati sono stati raggruppati in pool tra 7 e 10 ng/ μ L e tra 13 e 10 ng/ μ L di input di DNA. I criteri di accettazione non sono stati soddisfatti per la linea cellulare con inserto ITD lungo. Sebbene il 100% dei replicati abbia soddisfatto i criteri di validità, il CV complessivo e il CV tra gli input di DNA raggruppati in pool sono stati superiori al 25%.
- 17.11.3. La differenza negli SR medi mutante:wild-type tra gli input di DNA non ha superato il valore di 0,022 e le differenze tra le medie non sono risultate significativamente diverse. Il saggio è in grado di fornire risultati uniformi quando testato con input di DNA a 10 ± 3 ng/ μ L.

17.12. Validazione delle provette di prelievo ematico con EDTA

- 17.12.1. Questo studio aveva lo scopo di validare le provette di prelievo ematico con EDTA. Nello studio sono stati utilizzati campioni preparati artificialmente costituiti da linee cellulari con ITD di 21 bp, 126 bp e 279 bp e da linee cellulari di mutazione TKD D835 addizionate in sangue periferico prelevato di sodica o EDTA. I campioni rappresentavano SR mutante:wild-type con valore alto negativo, basso positivo (prossimo al valore soglia) e moderato positivo. Come veri campioni negativi è stato usato solo sangue periferico.
- 17.12.2. I campioni con valore basso positivo e moderato positivo hanno determinato replicati al 100% positivi sia in EDTA sia nell'eparina sodica. I campioni con valore alto negativo e veri negativi hanno determinato replicati al 100% negativi sia in EDTA sia in eparina sodica, soddisfacendo in tal modo i criteri di accettazione.
- 17.12.3. Tutti i criteri di accettazione per la validazione sono stati soddisfatti e le provette di prelievo ematico con EDTA sono validate per l'uso con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

17.13. Validazione del terreno per gradiente di densità

- 17.13.1. Questo studio aveva lo scopo di validare l'uso di qualsiasi terreno per gradiente di densità (con una densità di 1,077 g/ml) nel LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Le linee cellulari (inserto di 21 bp, inserto di 279 bp e TKD D835) sono state miscelate con sangue periferico sano corrispondente a tre frazioni cellulari mutanti di valore basso per linea cellulare (per un totale di nove membri del pannello). Il sangue periferico sano è stato testato anche come campione negativo *FLT3* (per un totale di un membro del pannello). Le cellule mononucleate sono state isolate da due replicati utilizzando tre produttori di terreni per gradiente di densità (DGM) da parte di due operatori in due giorni producendo un totale di otto replicati di isolati per membro del pannello per ogni terreno per gradiente di densità.
- 17.13.2. La percentuale di determinazioni positive complessive di altri due produttori di DGM (DGM2 e DGM3) è stata confrontata con il DGM che è stato validato inizialmente per l'uso con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay (DGM1). Il DGM1 aveva il 37,5% di determinazioni positive nei 10 membri del pannello. Il DGM2 aveva il 35% di determinazioni positive e il DGM3 il 36,3%, soddisfacendo pertanto i requisiti di determinazioni positive complessive entro il 10% di variazione dal DGM1 (rispettivamente 2,5% e 1,2%).
- 17.13.3. Tutti i criteri di accettazione dello studio sono stati soddisfatti ed è stato validato l'uso di qualsiasi terreno per gradiente di densità di 1,077 g/ml nel LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

17.14. Validazione di NEBuffer 3.1

- 17.14.1. Il disegno di questo studio prevedeva di fornire un'evidenza obiettiva che NEBuffer 3.1 possa essere utilizzato nel LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay invece di NEBuffer 3 e BSA. Cinque sostituzioni positive TKD D835, 5 delezioni positive TKD I836, un valore soglia TKD D835 e otto campioni di DNA negativo per TKD sono stati testati con un lotto di NEBuffer 3 e BSA e tre lotti di NEBuffer 3.1. Sono stati testati tre replicati per NEBuffer che hanno prodotto un totale di 12 replicati per campione.
- 17.14.2. Tutti i campioni positivi con NEBuffer 3 e BSA erano positivi anche con NEBuffer 3.1. Tutti i campioni negativi con NEBuffer 3 e BSA erano negativi con NEBuffer 3.1, con una concordanza del 100% tra i tipi di NEBuffer. La

differenza percentuale del rapporto di segnale tra i tipi di NEBuffer era compresa tra -4% e 5% per i campioni positivi e prossimi al valore soglia. L'intervallo %CV del rapporto di segnale per NEBuffer 3 era compreso tra 0 e 12,4% e per NEBuffer 3.1 era compreso tra 0 e 10,7%.

- 17.14.3. Tutti i criteri di accettazione dello studio sono stati soddisfatti ed è stato validato l'uso di qualsiasi terreno per gradiente di densità di 1,077 g/ml nel LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

17.15. Equivalenza: NEBuffer r3.1 vs NEBuffer 3.1

- 17.15.1. Lo studio era mirato a fornire l'evidenza obiettiva dell'equivalenza di NEBuffer r3.1 a NEBuffer 3.1 per il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. NEBuffer (3.1 o r3.1) viene usato con l'enzima di restrizione (endonucleasi) EcoRV per la digestione di ampliconi TKD al fine di rilevare due mutazioni TKD (D835 e I836) con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. L'unica differenza tra NEBuffer 3.1 e NEBuffer r3.1 è che l'albumina sierica bovina contenuta in NEBuffer 3.1 è sostituita con albumina ricombinante in NEBuffer r3.1. Il disegno dello studio prevedeva di testare 8 campioni clinici di DNA positivo per TKD (contenenti almeno un campione con mutazione I836) e 8 campioni clinici di DNA negativo per TKD in triplicato, utilizzando 3 lotti di NEBuffer r3.1 per confrontare 1 lotto di NEBuffer 3.1.
- 17.15.2. Tra NEBuffer r3.1 e 3.1 è stata osservata una concordanza del 100% per tutti i campioni. Tutti i campioni positivi per TKD sono stati determinati correttamente come positivi e tutti i campioni negativi per TKD sono stati determinati correttamente come negativi.
- 17.15.3. Tutti i criteri di accettazione sono stati soddisfatti e NEBuffer r3.1 è stato validato per l'uso con il LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay.

17.16. Precisione e riproducibilità multicentrica

- 17.16.1. Questo studio aveva lo scopo di determinare se le prestazioni del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay corrispondevano a quelle attese quando il saggio è stato testato in tre centri separati. I campioni sono stati preparati artificialmente utilizzando DNA di linee cellulari con un inserto di 126 bp e un inserto di 279 bp, DNA clinico con ITD con un inserto di 6 bp, un inserto di 69 bp e un inserto di 193 bp, DNA clinico con TKD con una sostituzione TKD D835 e una delezione TKD I836 e DNA clinico negativo per *FLT3*. Tutti i campioni clinici con una mutazione sono stati testati a tre livelli di rapporto di segnale: alto negativo, basso positivo e moderato positivo (per un totale di 15 membri del pannello). Due membri del pannello sono stati realizzati dal DNA clinico negativo e i campioni di DNA delle linee cellulari sono stati testati a due livelli di rapporto di segnale: alto negativo e basso positivo (per un totale di quattro membri del pannello). Sono stati testati complessivamente 21 membri del pannello in ogni centro.
- 17.16.2. Due operatori per centro, in due giorni non consecutivi per ogni operatore, hanno testato tre replicati per membro del pannello, alternando tra due di tre lotti di kit per centro. Ogni centro ha testato un totale di 24 replicati per membro del pannello per un totale di 72 replicati per membro del pannello in questo studio.
- 17.16.3. Il %CV del rapporto di segnale per i membri del pannello positivi (esclusi i membri del pannello costituiti da lunghi inserti ITD) era compreso tra 3,8% e 13,4% per tutti e tre i centri combinati (Tabella 20) e tra 3,3% e 19,8% per ciascun centro individualmente (meno del 25% di CV richiesto).

Tabella 20: Componenti della varianza per i membri del pannello di valore basso e moderato

Tipo PM	Livello SR	N.	Media complessiva	Centro/Strumento		Operatore		Giorno/Corsa		Lotto kit		Errore random		Variabilità totale	
				DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
Breve 6 bp ITD	LP	72	0,097	0,000	0,0	0,001	1,5	0,001	1,0	0,002	2,1	0,005	5,0	0,006	5,7
	MP	72	0,171	0,000	0,0	0,003	1,6	0,002	1,2	0,000	0,0	0,006	3,2	0,007	3,8
Terreno 69 bp ITD	LP	72	0,104	0,000	0,0	0,000	0,0	0,002	1,8	0,000	0,0	0,007	6,3	0,007	6,6
	MP	72	0,184	0,003	1,8	0,006	3,3	0,000	0,0	0,008	4,2	0,021	11,2	0,023	12,6
			70*	0,183	0,000	0,0	0,004	2,2	0,002	1,3	0,006	3,1	0,008	4,5	0,011
Terreno ITD 126 bp	LP	72	0,095	0,000	0,0	0,002	2,0	0,006	5,8	0,001	1,1	0,008	8,1	0,010	10,2
Lungo 192 bp ITD	LP	72	0,084	0,000	0,0	0,000	0,0	0,012	14,2	0,001	1,4	0,012	14,6	0,017	20,4
	MP	72	0,173	0,000	0,0	0,000	0,0	0,016	9,5	0,010	5,7	0,011	6,3	0,022	12,7
Lungo ITD 279 bp	LP	72	0,073	0,000	0,0	0,010	13,9	0,007	9,6	0,010	13,8	0,018	24,3	0,024	32,6
TKD D835	LP	72	0,095	0,002	2,3	0,004	4,1	0,004	4,3	0,000	0,0	0,007	7,5	0,009	9,9

Tabella 20: Componenti della varianza per i membri del pannello di valore basso e moderato

Tipo PM	Livello SR	N.	Media complessiva	Centro/Strumento		Operatore		Giorno/Corsa		Lotto kit		Errore random		Variabilità totale	
				DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
	MP	72	0,164	0,007	4,2	0,001	0,7	0,000	0,0	0,004	2,4	0,021	12,5	0,022	13,4
		71*	0,162	0,004	2,4	0,000	0,0	0,004	2,3	0,000	0,0	0,007	4,3	0,009	5,4
TKD I836	LP	72	0,083	0,002	2,1	0,000	0,0	0,003	4,0	0,001	0,7	0,004	4,3	0,005	6,2
	MP	72	0,153	0,004	2,4	0,000	0,0	0,003	2,3	0,002	1,5	0,006	4,0	0,008	5,4

*Gli outlier sono stati rimossi: due ITD di 69 bp di valore moderato positivo e una TKD D835 di valore moderato positivo

- 17.16.4. Il limite inferiore degli intervalli di confidenza al 95% a due code di Clopper-Pearson per le concordanze percentuali positive e negative (esclusi i membri del pannello costituiti da inserti lunghi ITD) per tutti e tre i centri combinati era rispettivamente $\geq 95,0\%$ e $90,3\%$, che superavano il criterio richiesto del 90%.
- 17.16.5. Tutti i criteri di accettazione dello studio sono stati soddisfatti ed è stata validata una versione distribuibile del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay per l'uso da parte di altri centri.

17.17. Equivalenza dei campioni di sangue periferico vs aspirato midollare

- 17.17.1. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è destinato a rilevare le mutazioni nel DNA genomico (gDNA) isolato da sangue periferico (PB) o aspirati midollare (BM). È stato condotto uno studio per fornire l'evidenza obiettiva che il gDNA isolato da BM e PB accoppiati produce risultati concordanti con entrambi i tipi di campioni.
- 17.17.2. I campioni di BM e PB accoppiati (dello stesso soggetto, acquisiti nella stessa data) sono stati prelevati prospetticamente dai centri clinici di prelievo per confermare gli studi di convalida analitica. Anche nell'ambito dello studio Astellas 2215-CL-0301 sono stati prelevati campioni accoppiati. La serie di campioni comprendeva 95 coppie: 62 provenienti dai centri di prelievo clinico e 33 provenienti dallo studio Astellas 2215-CL-0301. La concordanza positiva media (APA) e la concordanza percentuale negativa media (ANA) sono state calcolate utilizzando le due PPA e NPA ponderate con i totali marginali corrispondenti. Inoltre, gli intervalli di confidenza al 95% per APA e ANA sono stati calcolati utilizzando il metodo percentile di bootstrap non parametrico.
- 17.17.3. La Tabella 21 mostra i valori di concordanza tra i risultati di PB e BM per lo stato di mutazione *FLT3* complessivo. Come mostrato nella tabella qui di seguito, 94 pazienti su 95 erano concordanti tra PB e BM e solo una coppia ha prodotto un risultato discordante. Questo risultato era associato al risultato del campione di BM al valore soglia clinico (SR = 0,05).

Tabella 21: Concordanza tra sangue periferico e aspirato midollare - stato di mutazione *FLT3* complessiva

PB	BM		Totale
	BM+	BM-	
PB+	35	0	35
PB-	1	59	60
Totale	36	59	95

- 17.17.4. La Tabella 22 mostra la concordanza tra BM e PB utilizzando BM e PB come riferimento. Le stime puntiformi di NPA, PPA e OPA erano tutte superiori al 97%. Il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% dell'OPA era superiore al 94%, a dimostrazione della concordanza tra i tipi di campione BM e PB.

Tabella 22: Concordanza tra sangue periferico e aspirato midollare - stato di mutazione *FLT3* complessiva

Concordanza	Percentuale di concordanza (N)	IC 95% ⁽¹⁾
PPA BM	97,2% (35/36)	(85,5%, 99,9%)
PPA PB	100% (35/35)	(90,0%, 100%)
NPA BM	100% (59/59)	(93,9%, 100%)
NPA PB	98,3% (59/60)	(91,1%, 100%)
OPA	98,9% (94/95)	(94,3%, 100%)

⁽¹⁾L'IC al 95% è calcolato con il metodo esatto (Clopper-Pearson).

- 17.17.5. La Tabella 23 mostra la percentuale di concordanza positiva (APA) media e la percentuale di concordanza negativa (ANA) media tra i risultati di CDx ottenuti nel sangue periferico e nell'aspirato midollare. L'APA (ANA) è stata calcolata come media ponderata della PPA (NPA) utilizzando PB come riferimento e della PPA (NPA) utilizzando BM come riferimento. La stima puntiforme di APA e ANA è rispettivamente pari a 98,6% e 99,2%. I limiti inferiori degli intervalli di riferimento al 95% sono superiori al 95% per APA e ANA, a dimostrazione della concordanza tra i risultati per PB e BM.

Tabella 23: Concordanza media tra sangue periferico e aspirato midollare - stato di mutazione *FLT3* complessiva

Misura di concordanza	Percentuale Concordanza	IC 95% ⁽¹⁾
APA	98,6%	(95,1%, 100,0%)
ANA	99,2%	(97,2%, 100,0%)

⁽¹⁾L'IC al 95% è stato calcolato impiegando un metodo bootstrap non parametrico

- 17.17.6. La concordanza tra sangue periferico e aspirato midollare per lo stato della mutazione *FLT3* è elevata, a indicare che entrambi i tipi di campione sono appropriati per l'uso con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Le analisi dettagliate della concordanza tra il sangue periferico e l'aspirato midollare per ITD e TKD sono riportate nel Riassunto della sicurezza e delle prestazioni (280544).

18. Valutazione delle prestazioni cliniche

18.1. Studio clinico IVS-056-001 (studio clinico ADMIRAL)

18.1.1. Descrizione generale dello studio (IVS-056-001)

- 18.1.1.1. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è stato sviluppato da Invivoscribe (IVS) ed è approvato dall'FDA come test diagnostico di accompagnamento da utilizzare come ausilio per la valutazione della leucemia mieloide acuta (LMA). Allo scopo di dimostrare l'utilità clinica del test diagnostico di accompagnamento (CDx), i pazienti hanno fornito il consenso informato all'analisi dei loro campioni con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay e all'arruolamento in uno studio clinico cardine (studio di fase III 2215-CL-0301 che valuta l'efficacia di ASP2215). I due tipi di mutazioni nel gene *FLT3* rilevati dal test CDx per *FLT3* sono le mutazioni per duplicazione tandem interna (ITD) e le mutazioni del dominio tirosin-chinasico (TKD).
- 18.1.1.2. Per valutare l'accuratezza del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, è stato utilizzato un metodo di sequenziamento di nuova generazione basato sulla piattaforma MiSeq di Illumina, che è servito da fonte indipendente di informazioni sulla sequenza per le mutazioni ITD e TKD. L'analisi con il metodo di riferimento è stata sviluppata e validata da Invivoscribe per permettere di valutare la presenza o l'assenza di mutazioni ITD e TKD nel gene *FLT3*. Il saggio è stato quindi utilizzato per valutare l'accuratezza del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay usando il DNA estratto da campioni biologici prelevati durante lo screening e l'arruolamento nello studio 2215-CL-0301.

18.1.2. Obiettivi dello studio (IVS-056-001)

- 18.1.2.1. All'analisi finale, l'obiettivo co-primario dello studio era la stima dell'efficacia del gilteritinib fumarato nella popolazione risultata positiva con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, calcolata mediante l'applicazione di un test log-rank stratificato sulla sopravvivenza globale.
- 18.1.2.2. L'obiettivo dello studio con il metodo di riferimento è la valutazione indipendente della presenza o dell'assenza di mutazioni nel gene *FLT3* utilizzando la piattaforma MiSeq di sequenziamento di nuova generazione di Illumina per confermare l'accuratezza del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. L'obiettivo dello studio è descritto nella sezione Obiettivo secondario del protocollo, Studio cardine sul LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay CDx per il composto ASP2215.
- 18.1.3. Popolazione di pazienti (IVS-056-001)
- 18.1.3.1. All'analisi finale, 771 campioni di 633 soggetti sono stati sottoposti a screening con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Nella popolazione finale intent-to-treat (ITT), sono stati inclusi 371 soggetti. Cinque soggetti che sono risultati negativi con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay e arruolati in base a un'analisi locale del gene *FLT3* sono stati esclusi dalla Full Analysis Set (FAS). Pertanto, nella FAS per l'analisi finale sono stati utilizzati 366 soggetti randomizzati nello studio.
- 18.1.4. Selezione dei campioni per l'analisi con il metodo di riferimento (IVS-056-001)
- 18.1.4.1. Per l'analisi con il metodo di riferimento è stato selezionato un campione per soggetto. I campioni con volume insufficiente per l'analisi con il metodo di riferimento sono stati esclusi dallo studio. Complessivamente 467 campioni sono stati analizzati con il metodo di riferimento.
- 18.1.5. Analisi di sicurezza (IVS-056-001)
- 18.1.5.1. Non si prevede che il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay causi direttamente effetti indesiderati effettivi o potenziali, tuttavia i risultati del test possono avere un impatto diretto sui rischi associati al trattamento del paziente.
- 18.1.6. Efficacia (IVS-056-001)
- 18.1.6.1. All'analisi finale, l'OS mediana nel braccio gilteritinib fumarato è risultata più lunga (9,3 mesi) rispetto a quella della chemioterapia di salvataggio (5,6 mesi) nella popolazione CDx+. L'hazard ratio (HR) stratificato mediante regressione di Cox è stato stimato a 0,637 (IC 95% 0,488; 0,830) rispetto alla chemioterapia di salvataggio, valore p (log-rank stratificato a 1 coda) = 0,0004, corrispondente a una riduzione del rischio relativo di morte a favore del gilteritinib fumarato. Nella Figura 8 è mostrato il grafico di Kaplan-Meier.

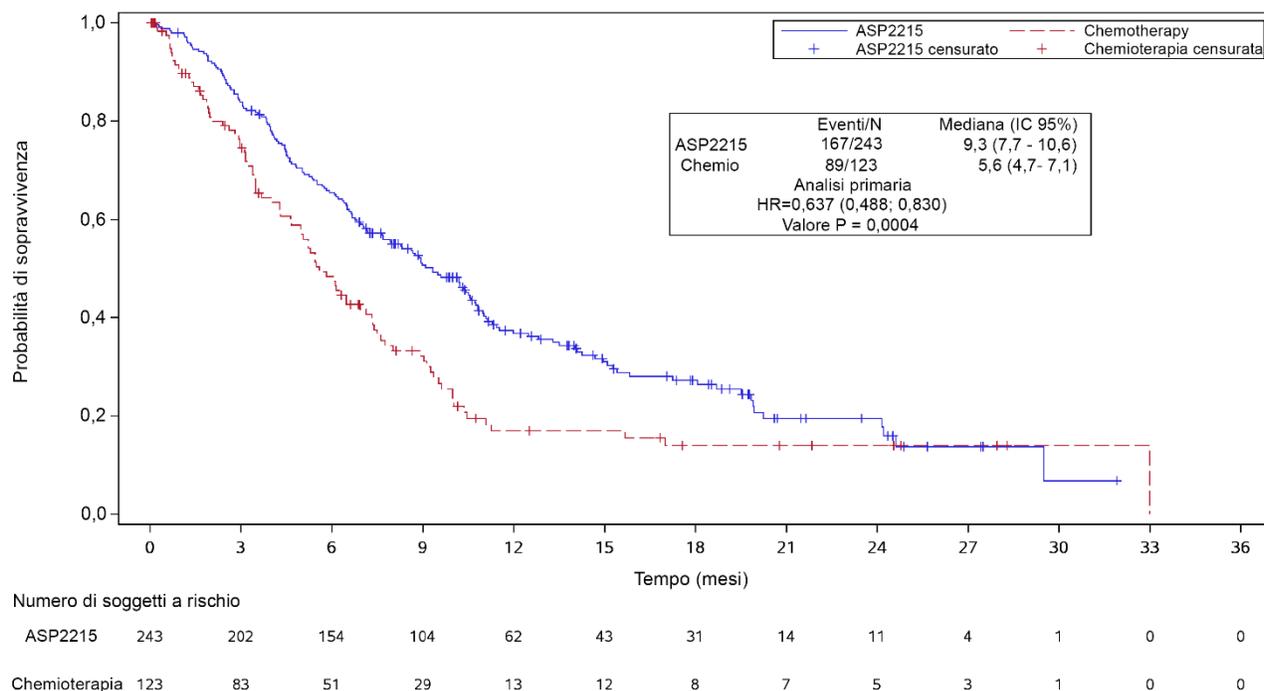


Figura 8 - Grafico di Kaplan-Meier della sopravvivenza globale.

- 18.1.6.2. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay ha mostrato concordanza con il metodo di riferimento. La concordanza complessiva era elevata (97,2%). Il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% dell'OPA è superiore al 90%, a dimostrazione della concordanza tra il *FLT3* Mutation CDx e il saggio di sequenziamento MiSeq.

Tabella 24: Concordanza tra CDx e sequenziamento MiSeq

Concordanza	Percentuale di concordanza (N)	IC 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⁾L'IC al 95% è calcolato con il metodo esatto (Clopper-Pearson).

Le stime puntiformi di PPA, NPA e OPA per ITD sono rispettivamente 100%, 92,8% e 97%. Le stime puntiformi di PPA, NPA e OPA per TKD sono rispettivamente 100%, 99,3% e 99,4%.

Tabella 25: Tabella di contingenza tra CDx per ITD e sequenziamento MiSeq

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

Tabella 26: Tabella di contingenza tra CDx per TKD e sequenziamento MiSeq

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

- 18.1.6.3. Utilizzando i suddetti dati di concordanza (Tabella 24), le prestazioni cliniche del dispositivo sono state determinate come riportato nella Tabella 27.

Tabella 27: Prestazioni cliniche

Misura delle prestazioni cliniche	Prestazioni calcolate
Sensibilità diagnostica	$\frac{300}{300 + 0} = 1$
Specificità diagnostica	$\frac{150}{150 + 13} = 0,92$
Rapporto di probabilità di risultato positivo	$\frac{1}{1 - 0,92} = 12,5$
Rapporto di probabilità di risultato negativo	$\frac{1 - 1}{0,92} = 0$

18.1.7. Conclusioni (IVS-056-001)

- 18.1.7.1. All'analisi finale, 366 soggetti sono stati inclusi nella Full Analysis Set. L'OS mediana nel braccio gilteritinib fumarato è risultata più lunga (9,3 mesi) rispetto a quella della chemioterapia di salvataggio (5,6 mesi) nella popolazione CDx+. L'hazard ratio (HR) stratificato mediante regressione di Cox è stato stimato a 0,637 (IC 95% 0,488; 0,830) rispetto alla chemioterapia di salvataggio, valore p (log-rank

stratificato a 1 coda) = 0,0004, corrispondente a una riduzione del rischio relativo di morte a favore del gilteritinib fumarato.

- 18.1.7.2. Per l'analisi con il metodo di riferimento, il criterio di accettabilità dello studio è stato soddisfatto: il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% esatto a due code (Clopper-Pearson) della percentuale di concordanza complessiva (OPA) era superiore al 90%. È stata stabilita la concordanza tra il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay e il metodo di riferimento di sequenziamento di nuova generazione MiSeq.

18.2. Studio ponte cardine IVS-062-005 (Sperimentazione clinica QuANTUM-First AC220-A-U302)

18.2.1. Panoramica dello studio (IVS-062-005)

- 18.2.1.1. Per supportare la sicurezza e l'efficacia del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay (CDx), era necessario dimostrare una concordanza clinica tra i campioni con stato *FLT3*-ITD determinato con il Saggio della sperimentazione clinica (CTA) AC220-A-U302 e il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay nella popolazione intent-to-treat. Questo studio ponte cardine corrisponde alla sperimentazione clinica di fase III AC220-A-U302 su quizartinib cloridrato in pazienti con LMA di nuova diagnosi che presentano mutazioni *FLT3*-ITD (QuANTUM-First). Questo studio ponte dimostra la sicurezza e l'efficacia del dispositivo e del farmaco quando i pazienti con LMA vengono stratificati con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay e trattati con quizartinib cloridrato, il che è probabile che fornisca un beneficio agli esiti dei soggetti senza esporli a rischi irragionevoli. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è inteso a supportare i medici nel prendere decisioni terapeutiche per i loro pazienti con LMA che presentano mutazioni *FLT3*-ITD.

18.2.1.2. Descrizione del Saggio di sperimentazione clinica

Navigate BP *FLT3*-ITD Mutation Assay (Navigate, Saggio di Sperimentazione clinica Daiichi Sankyo). Il Navigate BP *FLT3*-ITD Mutation Assay (Navigate, Saggio di Sperimentazione clinica Daiichi Sankyo: CTA) è stato sviluppato e convalidato da Navigate BioPharma Services Inc. (Carlsbad, CA). Si tratta di un test diagnostico in vitro destinato al rilevamento qualitativo di mutazioni con duplicazioni tandem interne (ITD) in *FLT3* da midollo osseo o sangue periferico prelevato in provette K2 (EDTA) utilizzando il QIAmp DSP DNA Blood Mini Kit di Qiagen e sottoposti a reazione a catena della polimerasi (PCR). Le mutazioni *FLT3*-ITD vengono identificate mediante amplificazione della regione situata tra gli esoni 14 e 15 del gene *FLT3* tramite PCR utilizzando un'unica serie di primer a DNA che fiancheggiano la regione. I prodotti PCR vengono quindi sottoposti a elettroforesi capillare e analisi dei frammenti sullo strumento ABI 3130xl utilizzando il software GeneMapper di ABI per risolvere e rilevare i prodotti PCR di dimensioni diverse. I prodotti di reazione con mutazioni ITD di dimensioni maggiori a 330 coppie di basi (bp) nonché il prodotto non mutante (ITD wild-type) di 330 bp vengono rilevati dall'analisi dei frammenti. La percentuale di mutanti (% Mutante) o la frequenza allelica delle varianti (VAF) per ciascun campione viene calcolata dividendo l'area sotto la curva (AUC) del picco di mutanti massima per la somma dell'AUC dei picchi di mutanti e non mutanti (330 bp) e moltiplicando per 100. Il campione di un paziente è considerato positivo se la VAF raggiunge o supera la soglia clinica del 3%. Questo saggio è stato sviluppato per rilevare solo mutazioni causate da inserzioni ITD nel gene *FLT3*.

Tutti i test vengono condotti in un laboratorio certificato CLIA seguendo le normative CLIA e approvati da un patologo per il *FLT3*-ITD Mutation Assay.

- 18.2.1.3. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay è stato sviluppato da Invivoscribe come test diagnostico complementare da utilizzare a supporto della valutazione di pazienti con LMA per i quali viene preso in considerazione il trattamento con quizartinib cloridrato. In questo studio ponte è stata valutata la concordanza con il CTA e l'efficacia del farmaco quando i pazienti vengono stratificati in base al LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

18.2.2. Obiettivi dello studio (IVS-062-005)

- 18.2.2.1. Dimostrare la concordanza rispetto alla selezione di soggetti *FLT3*-TD positivi tra il Saggio di sperimentazione clinica e il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay valutando la percentuale di concordanza dei positivi e dei negativi (PPA e NPA, rispettivamente) tra i due saggi.
- 18.2.2.2. Determinare se quizartinib prolunga la sopravvivenza complessiva (OS) rispetto al placebo in soggetti con LMA di nuova diagnosi che presentano una mutazione *FLT3*-ITD determinata mediante il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay (popolazione CTA(+), CDx(+)).
- 18.2.3. Popolazione di pazienti (IVS-062-005)

18.2.3.1. 3468 pazienti sono stati sottoposti a screening con il Saggio di sperimentazione clinica Daiichi Sankyo per l'arruolamento nello studio AC220-A-U302, con 1033 messi a disposizione dallo sponsor del farmaco per lo studio ponte. I campioni di 1029 soggetti hanno soddisfatto i criteri di inclusione per l'analisi con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Di questi 1029 soggetti, 513 erano CTA(+) e 516 erano CTA(-). Una volta completata l'analisi dei campioni con il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, 1023 soggetti hanno prodotto risultati validi sia con il CTA che con il CDx e sei soggetti hanno prodotto risultati non validi con il CDx.

18.2.4. Analisi di sicurezza (IVS-062-005)

18.2.4.1. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay non dovrebbe causare direttamente effetti avversi effettivi o potenziali, ma i risultati del test potrebbero influire direttamente sui rischi per il paziente correlati al trattamento.

18.2.5. Efficacia (IVS-062-005)

18.2.5.1. Il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay ha dimostrato concordanza con il CTA ed efficacia comparabile allo studio AC220-A-U302.

18.2.5.1.1. L'analisi primaria ha dimostrato:

La concordanza tra il LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation e il CTA è stata dimostrata sulla base di un sottoinsieme di 1029 risultati. Le stime puntuali per PPA e NPA erano superiori al 90%.

Tabella 28: Contingenza tra CDx e CTA

ITD CDx	ITD CTA		Totale
	CTA(+)	CTA(-)	
CDx(+)	483	0	483
CDx(-)	27	513	540
Non valido	3	3	6
Totale	513	516	1029

Non valido significa che un campione è stato analizzato con il saggio CDx ma non ha dato un risultato valido.

I valori di concordanza con risultati CDx non validi (IC al 95%) sono:

- PPA 94,2% (91,8-96,0%)
- NPA 99,4% (98,3-99,9%)

18.2.5.1.2. Efficacia nella popolazione (CTA(+), CDx(+)) (483 soggetti):

È stata valutata l'efficacia di quizartinib cloridrato sulla sopravvivenza complessiva (OS) nella popolazione CDx-positiva. Nella popolazione (CTA(+), CDx(+)), il trattamento con quizartinib in combinazione con la chemioterapia standard ha determinato un miglioramento clinicamente rilevante dell'OS rispetto al placebo. L'OS mediana nel braccio quizartinib era di 29,4 mesi (19,1-NE) rispetto a 14,8 mesi (13,1-26,2) per il placebo, da cui ne deriva un prolungamento di 14,6 mesi dell'OS mediana (valore p log-rank stratificato bilaterale = 0,0640). Il rapporto di rischio (HR) stratificato è stato stimato a 0,794 (0,621-1,014) rispetto al placebo, corrispondente a una riduzione del rischio relativo di decesso del 20,6% in favore di quizartinib. I risultati erano paragonabili a quelli osservati nello studio QuANTUM-First (AC220-A-U302).

18.2.5.1.2.1. Efficacia nella popolazione ITD (CTA(+)) (539 soggetti):

È stata valutata l'efficacia di quizartinib cloridrato sulla sopravvivenza complessiva (OS) nella popolazione CTA-positiva. Nella popolazione CTA(+), il trattamento con quizartinib in combinazione con la chemioterapia standard ha determinato un miglioramento clinicamente rilevante dell'OS rispetto al placebo. L'OS mediana nel braccio quizartinib era di 31,9 mesi (21,0-NE) rispetto a 15,1 mesi (13,2-26,2) per il placebo, da cui ne deriva un prolungamento di 16,8 mesi dell'OS mediana (valore p log-rank stratificato bilaterale = 0,0324). Il rapporto di rischio (HR) stratificato è stato stimato a 0,776 (0,615-0,979) rispetto al placebo, corrispondente a una riduzione del rischio relativo di decesso del 22,4% in favore di quizartinib. I risultati erano paragonabili a quelli osservati nello studio QuANTUM-First (AC220-A-U302).

18.2.6. Conclusioni (IVS-062-005)

- 18.2.6.1. Nel loro complesso, questi risultati supportano il potenziale del LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay di identificare la stessa popolazione di pazienti con LMA di quella arruolata nella sperimentazione clinica AC220-A-U302 in relazione a mutazioni ITD nel gene *FLT3*.

19. Bibliografia

- 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, Kodera 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.
- 280544 Summary of Safety and Performance – LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay. www.eudamed.eu/.

20. Assistenza tecnica e Servizio clienti

Contatti



Invivoscribe, Inc

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

Telefono: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Orari di lavoro: 7:00 AM - 5:00 PM PST/PDT

Assistenza tecnica: support@invivoscribe.com | Servizio clienti: sales@invivoscribe.com | Sito web: www.invivoscribe.com

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

21. Simboli

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

	Per uso diagnostico in vitro		Marchio CE
	Numero di catalogo		Data di scadenza
	Volume del reagente		Rappresentante autorizzato nella Comunità europea
	Numero di lotto		Produttore
	Condizioni di conservazione		Data di produzione
	Consultare le istruzioni per l'uso		DNA polimerasi Taq
	Controllo positivo		Enzima EcoRV
	Controllo senza template		NEBuffer r3.1
	Controllo di estrazione		Master mix
	Revisione		Identificatore univoco del dispositivo
	Rappresentante Autorizzato per la Svizzera		Persona responsabile nel Regno Unito

22. Avviso legale

Per gli Avvisi legali relativi a questo prodotto, visitare: <https://invivoscribe.com/legal-notices/>

23. Cronologia delle revisioni

Tabella 29: Cronologia delle revisioni delle Istruzioni per l'uso

Revisione	Data della versione	Modifica
A	Luglio 2023	Versione iniziale
B	Dicembre 2023	Aggiornamento dei requisiti di sistema del software applicabili alla versione 1.1.3.IVD. Correzione della versione del DCS in Tabella 2. Aggiornato "LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software" al nome completo nelle istruzioni d'uso per PFIGS. Eliminate le istruzioni su come cambiare il locale del sistema operativo per il software v1.1.2.IVD.
C	Agosto 2024	Aggiunta di VANFLYTA® alla destinazione d'uso. Aggiunta della Panoramica dello studio ponte cardine alla valutazione delle prestazioni cliniche (IVS-062-005). Sostituzione dell'Avviso legale con il link alla pagina Internet degli Avvisi legali.
D	Ottobre 2024	Correzione della versione del DCS in Tabella 2.
E	Novembre 2024	Traduzione corretta della possibile causa e dell'azione correttiva per il messaggio di errore AD03 nella Tabella 9.
F	Febbraio 2025	Aggiunta di simboli e definizioni per altri rappresentanti regionali alla Sezione 21.
G	Marzo 2025	Rimozione dell'opzione relativa all'uso del software di raccolta dati (DCS) per l'analisi. Incluso il requisito di utilizzo di GM v6.0 with patch B02.