

Instrucciones de uso

CE 2797 IVD

LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay

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

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*



Número de catálogo

REF K4120431

Producto

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

Cantidad

33 reacciones

Índice

1.	MARCA COMERCIAL	4
2.	USO PREVISTO	4
3.	INDICACIONES/CONTRAINDICACIONES	4
4.	GLOSARIO	4
5.	RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA	4
6.	PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO	5
6.1.	Mutaciones por duplicación interna en tándem (DIT) de <i>FLT3</i>	5
6.2.	Mutaciones en el dominio tirosina cinasa (DTC) de <i>FLT3</i>	6
6.3.	Usuario final y entorno de uso	6
7.	REACTIVOS Y MATERIALES	7
8.	INSTRUMENTOS/ACCESORIOS	11
8.1.	Software (suministrado)	11
9.	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	12
9.1.	Seguridad cibernética	13
10.	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	14
10.1.	Precauciones	14
10.2.	Sustancias que pueden afectar a la PCR	14
10.3.	Requisitos y manipulación de las muestras	14
11.	PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA	14
11.1.	Inspección de la muestra	14
11.2.	Preparación para el procesamiento de la muestra	14
11.3.	Dilución de las muestras clínicas	14
11.4.	Aislamiento de células mononucleares (CMN)	14
11.5.	Recuento de células mononucleares	15
11.6.	Preparación de las muestras para extracción de ADN y finalización del aislamiento	15
11.7.	Preparación de la estación de automatización QIAcube	15
11.8.	Extracción del ADN	16
11.9.	Cuantificación y dilución del ADN	16
11.10.	Amplificación	17
11.11.	Digestión con la enzima de restricción (solo para mutados en el DTC)	18
11.12.	Detección mediante electroforesis capilar	19
11.13.	Preparación de la solución patrón, si es necesaria	20
11.14.	Preparación de la placa de muestras	20
11.15.	Configuración de PlateMapper con el software LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software	21
11.16.	Configuración del software del equipo 3500xL o 3500xL Dx	29
11.17.	Desarrollo en el analizador genético 3500xL o 3500xL Dx	31
11.18.	Análisis de datos con el software GeneMapper	31
11.19.	Análisis de datos con el software LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software	32
12.	CONTROL DE CALIDAD	38
12.1.	Validez del desarrollo	38
12.2.	Control de extracción y validez de las muestras	38
13.	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	39
14.	REPETICIÓN DE LA PRUEBA	40
14.1.	Desarrollos no válidos	40
14.2.	Control de extracción no válido en desarrollos válidos	40
14.3.	Muestras no válidas en desarrollos válidos	40
14.4.	Códigos de error y repetición de la prueba	40
14.5.	Varios errores en un mismo desarrollo	44
14.6.	Cambio de colorante	45
15.	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	45
16.	VALORES PREVISTOS	46
16.1.	Tamaños previstos de los productos amplificados	46

17.	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO NO CLÍNICO	46
17.1.	Sensibilidad analítica: límite del blanco (LB).....	46
17.2.	Sensibilidad analítica	46
17.3.	Precisión.....	48
17.4.	Reproducibilidad entre operarios (estirpes celulares).....	48
17.5.	Reproducibilidad entre operarios (muestras clínicas)	48
17.6.	Reproducibilidad entre lotes y entre instrumentos.....	49
17.7.	Sustancias interferentes: exógenas.....	49
17.8.	Sustancias interferentes: endógenas.....	49
17.9.	Sustancias interferentes: fármacos	50
17.10.	Transferencia y contaminación cruzada	50
17.11.	Aportaciones de ADN.....	50
17.12.	Validación de tubos de extracción de sangre con EDTA.....	50
17.13.	Validación de medios en gradiente de densidad	50
17.14.	Validación del NEBuffer 3.1	51
17.15.	Equivalencia: NEBuffer r3.1 frente a NEBuffer 3.1	51
17.16.	Precisión y reproducibilidad en distintos centros.....	51
17.17.	Equivalencia de muestras de sangre periférica y médula ósea.....	52
18.	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO CLÍNICO	53
18.1.	Estudio clínico IVS-056-001 (ensayo clínico ADMIRAL).....	53
18.2.	Estudio puente fundamental IVS-062-005 (ensayo clínico QuANTUM-First AC220-A-U302).....	56
19.	BIBLIOGRAFÍA	58
20.	SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE	58
21.	SÍMBOLOS.....	59
22.	AVISO LEGAL.....	59
23.	HISTORIAL DE REVISIONES.....	59

1. Marca comercial

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

2. Uso previsto

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay es un dispositivo de prueba de diagnóstico *in vitro* por PCR diseñado para detectar la duplicación interna en tándem (DIT) y las mutaciones D835 e I836 en el dominio tirosina cinasa (DTC) del gen *FLT3* en ADN genómico extraído de células mononucleares obtenidas de sangre periférica o aspirados de médula ósea de pacientes con diagnóstico de leucemia mielógena aguda (LMA). LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay puede utilizarse como dispositivo de diagnóstico complementario para los siguientes tratamientos:

En las regiones en las que está autorizado XOSPATA® (fumarato de gilteritinib), LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se utiliza para facilitar la evaluación de pacientes con LMA para los que se está considerando el tratamiento con XOSPATA (fumarato de gilteritinib).

En las regiones en las que está autorizado VANFLYTA® (clorhidrato de quizartinib), LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se utiliza para facilitar la evaluación de pacientes con *FLT3*-ITD+ LMA para los que se está considerando el tratamiento con VANFLYTA® (clorhidrato de quizartinib).

Esta prueba cualitativa no automatizada se ha diseñado para usarse con los analizadores genéticos 3500xL o 3500xL Dx.

3. Indicaciones/contraindicaciones

No se conocen contraindicaciones.

4. Glosario

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

5. Resumen y explicación de la prueba

Por lo general, la leucemia mielógena aguda (LMA) tiene un mal pronóstico. Muchos de los estudios sobre LMA han demostrado que la presencia de mutaciones activadoras de *FLT3* presagia un mal pronóstico, por lo que son un objetivo atractivo en cuanto al tratamiento.^{1,2} LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay está dirigido a regiones del gen *FLT3*, a fin de identificar mutaciones por duplicación interna en tándem (DIT) y mutaciones en el dominio tirosina cinasa (DTC), como las mutaciones D835 e I836.

Con LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, se incluyen reactivos y un software específico para pruebas con los que se determina la presencia o ausencia de mutaciones de *FLT3* en ADN humano extraído de células mononucleares aisladas de muestras de sangre periférica o médula ósea de los pacientes. El ADN se amplifica por PCR y el amplicón del DTC se digiere por vía enzimática. Los amplicones se detectan por electroforesis capilar en el analizador genético 3500xL o 3500xL Dx. El estado mutacional de *FLT3* se determina con el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software. Se indica que la mutación por DIT y en DTC de *FLT3* es positiva si la

relación de la señal mutado-sin mutar cumple o supera un valor de corte de 0,05 (consulte el apartado 13, *Interpretación de los resultados*). La Figura 1 recoge una representación esquemática de la secuencia de trabajo.

6. Principios del procedimiento

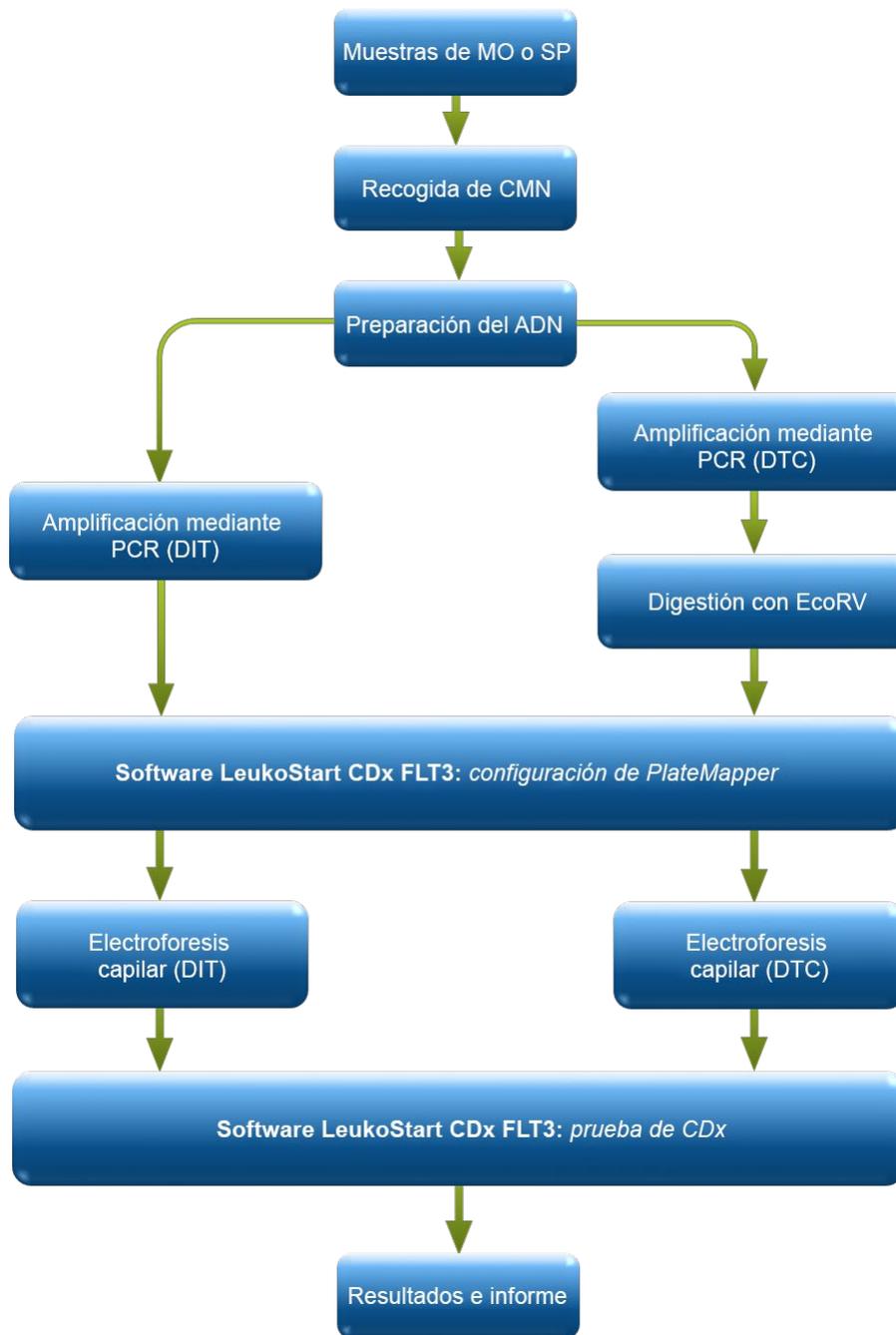


Figura 1: Resumen de la secuencia de trabajo

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

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

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay utiliza los cebadores que se encuentran en la región YM y alrededor de ella. Los cebadores de PCR directos e inversos están marcados por fluorescencia con diferentes fluoróforos que sirven para confirmar la

presencia de la señal en la muestra. Los alelos de *FLT3* sin mutar se amplifican y generan un producto de 327±1 pb de acuerdo con la prueba, mientras que los alelos con mutaciones por DIT generan un producto de más de 327±1 pb (Figura 2).

6.2. Mutaciones en el dominio tirosina cinasa (DTC) de *FLT3*

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

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

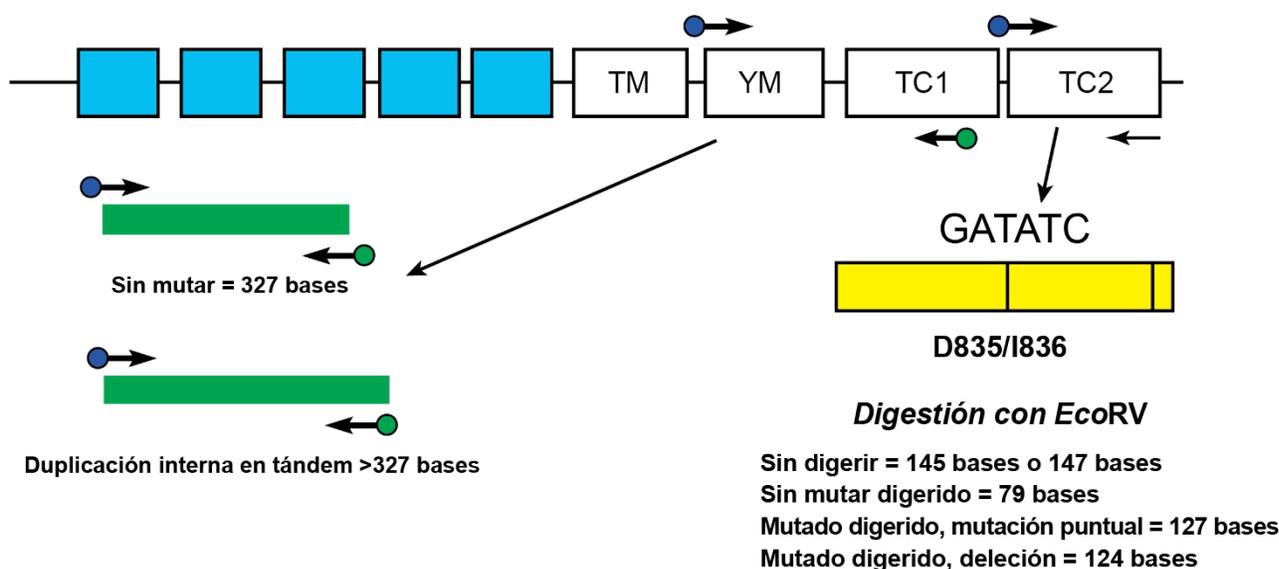


Figura 2: Representa la región yuxtamembrana (YM) de *FLT3* (TM = transmembrana) y el bucle de activación del dominio tirosina cinasa (TC). Las flechas negras representan las posiciones relativas de los cebadores que se dirigen a la región YM (en caso de DIT) o al bucle de activación del dominio cinasa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

6.3. Usuario final y entorno de uso

Este dispositivo es solo para uso profesional en laboratorios clínicos. El uso del producto debe limitarse a técnicos que conozcan las técnicas de PCR y LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

7. Reactivos y materiales

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

Tabla 1: Lista de reactivos de LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, **REF** K4120431

Número de catálogo	Nombre del reactivo	Etiqueta del reactivo	Temperatura de conservación	Cant. por unidad	Núm. de unidades/kit
REF R0880280 **	Control de extracción de <i>FLT3</i>	<i>FLT3</i> CONTROL EC		1800 µL/frasco	1 frasco
REF B4120151 *	Mezcla maestra: DIT para <i>FLT3</i>	<i>FLT3</i> ITD MM		1500 µL/frasco	1 frasco
REF B4120161 *	Mezcla maestra: DTC para <i>FLT3</i>	<i>FLT3</i> TKD MM		1500 µL/frasco	1 frasco
REF R0880260 **	Control positivo: DIT para <i>FLT3</i>	<i>FLT3</i> ITD CONTROL +		100 µL/frasco	1 frasco
REF R0880270 **	Control positivo: DTC para <i>FLT3</i>	<i>FLT3</i> TKD CONTROL +		100 µL/frasco	1 frasco
REF R0930080 **	Control sin molde para <i>FLT3</i>	<i>FLT3</i> CONTROL NTC		200 µL/frasco	1 frasco
REF 261942	ADN polimerasa Taq (Taq)	TAQ		200 µL/frasco	1 frasco
REF 261944	Enzima EcoRV	EcoRV		200 µL/frasco	1 frasco
REF 261987*	NEBuffer r3.1	NEB3.1		1250 µL/frasco	1 frasco

*Los frascos de mezclas maestras y NEBuffer r3.1, una vez abiertos, pueden someterse hasta a 4 ciclos de congelación y descongelación.

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

Tabla 2: Reactivos, materiales y equipos adicionales necesarios (no suministrados)

Plataforma de capilaridad	Reactivo o material	Reactivo o material y proveedor	Número de catálogo	Notas
Analizador genético de la serie 3500xL	Formamida Hi-Di	ThermoFisher Scientific • Formamida Hi-Di™ (5 mL)	4401457 (1x5 mL) 4440753 (4x5 mL)	N. P.
	Patrones de tamaño LIZ	ThermoFisher Scientific: • Patrón de tamaño marcado para GeneScan™ 600 LIZ™ v2.0	4408399	N. P.
	Polímero	ThermoFisher Scientific: • Polímero POP-7™ para los analizadores genéticos 3500/3500xL	4393708	N. P.
	Solución amortiguadora	Thermo Fisher Scientific: • Contenedor de amortiguación anódica (CAA), serie 3500	4393927	N. P.
		Thermo Fisher Scientific: • Contenedor de amortiguación catódica (CAC), serie 3500	4408256	N. P.
	Instrumento y software para electroforesis capilar	Thermo Fisher Scientific: • Analizador genético 3500xL con software de recogida de datos (DCS) v3.3	4405633	Este instrumento no tiene el marcado CE.
Thermo Fisher Scientific: • GeneMapper™ v6.0, instalación completa con parche "B02" • Nombre oficial del parche "B02": parche GM_PeakHeight_202110 para		A38888	Este software no tiene marcado CE. El número de catálogo es para Windows 10.	

Tabla 2: Reactivos, materiales y equipos adicionales necesarios (no suministrados)

Plataforma de capilaridad	Reactivo o material	Reactivo o material y proveedor	Número de catálogo	Notas
Analizador genético de la serie 3500xL		el software GeneMapper™ v6.0 instalación completa		Solicitar parche a Thermo Fisher Scientific.
	Matriz de capilares	ThermoFisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Matriz de 24 capilares para el analizador genético 3500xL, 50 cm 	4404689	N. P.
	Membranas de goma	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Membrana de goma para el contenedor de amortiguación catódica (analizadores genéticos de la serie 3500) 	4410715	N. P.
		Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Membrana de goma para los analizadores genéticos 3500/3500xL, 96 pocillos 	4412614	N. P.
	Conjunto de base y retenedor	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Conjunto de base y retenedor (estándar) para los analizadores genéticos 3500/3500xL, 96 pocillos 	4410228	N. P.
	Colorantes para calibración espectral	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) 	4345833	N. P.
Analizador genético de la serie 3500xL Dx	Formamida Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Formamida Hi-Di™ para analizadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx (CE-IVD) 	4440752 (4x5mL) 4404307 (1x5mL)	N. P.
	Patrones de tamaño LIZ	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Patrón de tamaño marcado para GeneScan™ 600 LIZ™ v2.0 	A25794	N. P.
	Polímero	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Polímero POP-7™ para analizadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx 	4393709	N. P.
	Solución amortiguadora	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Contenedor de amortiguación anódica para analizadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx 	4393925	N. P.
		Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Contenedor de amortiguación catódica para analizadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx 	4408258	N. P.
	Instrumento y software para electroforesis capilar	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Analizador genético 3500xL Dx (24 capilares) de Applied Biosystems con el DCS 3.0 	A27856	N. P.
		Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> GeneMapper™ v6.0, instalación completa con parche "B02" Nombre oficial del parche "B02": parche GM_PeakHeight_2021110 para el software GeneMapper™ v6.0 instalación completa 	A38888	Este software no tiene marcado CE. El número de catálogo es para Windows 10. Solicitar parche a Thermo Fisher Scientific.
Matriz de capilares	Thermo Fisher Scientific:	4404688	N. P.	

Tabla 2: Reactivos, materiales y equipos adicionales necesarios (no suministrados)

Plataforma de capilaridad	Reactivo o material	Reactivo o material y proveedor	Número de catálogo	Notas
		<ul style="list-style-type: none"> Matriz de 24 capilares para el analizador genético 3500xL, 50 cm 		
	Membranas de goma	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Membrana de goma para el contenedor de amortiguación catódica para los analizadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx 	4410716	N. P.
		Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Membrana de goma para los analizadores genéticos 3500/3500xL, 96 pocillos 	4410700	N. P.
	Conjunto de base y retenedor para 3500xL Dx	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Conjunto de base y retenedor (estándar) para los analizadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx, 96 pocillos 	4410227	N. P.
	Colorantes para calibración espectral	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> DS-33 Matrix Standard Kit Dx (Dye Set G5) 	A25775	N. P.
Necesario para ambas plataformas de capilaridad	Pipetas calibradas	<ul style="list-style-type: none"> Monocanal, de 5-120 µL De ocho canales, 0,2-10 µL o equivalente Pipetas P-2M, P-10N, P-20N, P100N, P-200N y P-1000N o equivalentes 	N. P.	Deben ser capaces de medir con precisión volúmenes de entre 0,5 µL y 1000 µL.
	Termociclador	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Termociclador Veriti™ Dx de 96 pocillos, 0,2 mL 	4452300	N. P.
	Agitador vorticial	N. P.	N. P.	N. P.
	Placas o tubos para PCR	N. P.	N. P.	Placas con faldones para uso en biología molecular
	Puntas de pipeta con barrera de filtro	N. P.	N. P.	Exentas de RNasa, DNasa y pirógenos para uso en biología molecular
	Microcentrífuga	N. P.	N. P.	N. P.
	Lámina de aluminio para placas de 96 pocillos	N. P.	N. P.	N. P.
	Tiras de 96 pocillos y 8 tapas	N. P.	N. P.	N. P.
	Agua de calidad USP o para biología molecular desionizada y destilada en vidrio	N. P.	N. P.	Estéril y exenta de RNasa y DNasa
	Extracción del ADN	Qiagen: <ul style="list-style-type: none"> Minikit de ADN en sangre DSP QIAamp® 	61104	Incluye una serie de soluciones amortiguadoras (AL, AW1, AW2 y AE), disolvente para proteasas, proteasa, tubos de elución y

Tabla 2: Reactivos, materiales y equipos adicionales necesarios (no suministrados)

Plataforma de capilaridad	Reactivo o material	Reactivo o material y proveedor	Número de catálogo	Notas
				columnas de centrifugación
	Aislamiento de células mononucleares	Medio para gradiente de densidad	N. P.	Densidad: 1,077 g/mL
	Solución salina amortiguada	Solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (SSAFD)	N. P.	N. P.
	Medio de crecimiento	RPMI 1640 con L-glutamina	N. P.	N. P.
	Contador de células	N. P.	N. P.	Capaz de contar células nucleadas
	Espectrofotómetro UV de microvolúmenes	Espectrofotómetro UV	N. P.	Capaz de determinar la absorbancia a 260 nm para el cálculo de la concentración del ácido nucleico
	Alcohol etílico/etanol	N. P.	N. P.	Etanol al 96-100 %
	Sistema de extracción de ADN	QIAgen: <ul style="list-style-type: none"> Sistema QIAcube (220-240 V) QIAcube Connect (222-240 V) 	9001293 9002864	N. P.

Tabla 3: Materiales generales de laboratorio (no suministrados)

Descripción de los materiales
Tubos cónicos de 15 mL
Tubos cónicos de 50 mL
Pipetas serológicas de 5 mL, 10 mL y 25 mL
Toallitas sin pelusa
Cronómetro calibrado
Cubo de hielo y hielo
Recipiente para desechos líquidos
Tubos de superficie no aglutinante del volumen adecuado para diluciones y alícuotas de ADN
Tubos del volumen adecuado para SSAFD, PCR y mezcla maestra para digestión
Tapones de rosca para tubos de muestras QIAcube
Pipetas de transferencia desechables
Puntas de pipeta
Placas para electroforesis capilar, con faldón, 96 pocillos

8. Instrumentos/accesorios

NOTA: Este dispositivo debe usarse con los analizadores genéticos 3500xL o 3500xL Dx y el software de recogida de datos asociado instalado en cada instrumento.

NOTA: Mantenga el equipo adecuadamente y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

8.1. Software (suministrado)

8.1.1. **REF** : K4120441 incluye:

- LeukoStrat® CDx *FLT3* Software v1.1.x.IVD
- Carpeta “3500xL Dx Files”, que contiene:
 - ITD CDx Assay.xml
 - TKD CDx Assay.xml
- Carpeta “3500xL RUO Files”, que contiene:
 - ITD CDx Assay.xml
 - TKD CDx Assay.xml

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

8.1.1.1. Requisitos del equipo:

- Sistema operativo: Windows™ 10 Pro o Windows™ 11 Pro
- Procesador: se recomienda disponer de una CPU con Intel Core 2 Duo o una versión más reciente
- RAM: 4 GB como mínimo
- Espacio disponible en disco: 5 GB como mínimo
- Unidad de CD-ROM
- Adobe Acrobat Reader 2022 o 2023

9. Advertencias y precauciones



- Lea atentamente las instrucciones de uso antes de comenzar la prueba y siga cada paso con exactitud.
- Este dispositivo solo se ha validado para su uso con los analizadores genéticos 3500xL o 3500xL Dx y el software de recogida de datos asociado instalado en cada instrumento.
- El dispositivo debe usarse como sistema. No utilice reactivos de otros fabricantes.
- Cualquier alteración del protocolo —como la realización de diluciones o reducciones de las reacciones de amplificación— puede afectar al rendimiento de la prueba e implicar la anulación de cualquier garantía derivada de la adquisición de estos kits.
- No mezcle ni combine reactivos de kits con diferentes números de lote.
- Los materiales son estables hasta la fecha de validez indicada cuando se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de la fecha de validez.
- Elimine los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con las normativas nacionales, regionales y locales.
- Anote el número de ciclos de congelación y descongelación de reactivos.
- Utilice equipos de protección personal estándar (guantes, batas de laboratorio y gafas protectoras) para realizar las tareas de laboratorio. Siga las prácticas óptimas de laboratorio y tome las precauciones necesarias cuando trabaje con muestras. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo del laboratorio. Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos de la prueba. Manipule las muestras en instalaciones aprobadas de contención de seguridad biológica y ábralas solo en campanas de seguridad biológica certificadas.
- Dado que se trata de una prueba de sensibilidad analítica, debe ser extremadamente cauteloso para evitar la contaminación de los reactivos o mezclas de amplificación con muestras, material de referencia o material amplificado. Use puntas de pipeta nuevas y resistentes a aerosoles entre muestras y reactivos de dispensación. Preste mucha atención a los reactivos para detectar posibles signos de contaminación (p. ej., controles negativos con señales positivas). Elimine cualquier reactivo que pueda haberse contaminado.
- Para reducir al mínimo la contaminación, use guantes limpios cuando manipule muestras y reactivos y limpie de manera regular las zonas de trabajo y las pipetas antes de realizar la PCR.
- La esterilización por autoclave no elimina la contaminación del ADN. En el laboratorio de PCR, siga una secuencia de trabajo unidireccional entre zonas de trabajo independientes: empiece por la zona de preparación de muestras, siga en la de amplificación y, por último, acceda a la de detección. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para la preparación de las muestras.
- Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica deben ser de uso exclusivo de dicha zona.
- Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación con RNasa y DNasa o la contaminación cruzada.
- Todos los instrumentos y equipos deben mantenerse y calibrarse de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.
- Cuando el recipiente haya alcanzado la temperatura ambiente, examine el interior del cuello de cada recipiente del polímero POP-7. Asegúrese de que el accesorio no contenga restos de polímero secos ni cristalizados. No introduzca el contenido del recipiente en el equipo 3500xL o 3500xL Dx si observa cristalización, pues esta podría afectar al rendimiento de LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay y del propio equipo 3500xL o 3500xL Dx. En caso de cristalización, no instale la bolsa en el instrumento 3500xL o 3500xL Dx y póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de ThermoFisher.
- Si el dispositivo no funciona del modo previsto o no interpreta correctamente los resultados de la prueba, los resultados de la mutación de *FLT3* podrían ser incorrectos, lo que afectaría a las decisiones terapéuticas contra la LMA³.
 - Un resultado falso negativo haría que el paciente con LMA no experimentara los beneficios asociados con el tratamiento con gilteritinib fumarato (XOSPATA[®]) o con clorhidrato de quizartinib (VANFLYTA[®]). Sin embargo, el paciente se sometería a una quimioterapia intensa, que es el tratamiento de referencia para la LMA.
 - Un paciente con un resultado falso positivo se trataría con gilteritinib fumarato (XOSPATA[®]) o clorhidrato de quizartinib (VANFLYTA[®]), que no aportaría los beneficios esperados. Para conocer los acontecimientos adversos relacionados con estos tratamientos, consulte el etiquetado del fabricante farmacéutico correspondiente.

NOTA: Si se utilizan muestras o reactivos incorrectos o no se siguen atentamente estas instrucciones, existe riesgo de retraso en los resultados, lo que puede provocar un retraso en el tratamiento.

- Cualquier incidencia grave que se haya producido en relación con el producto debe comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro del usuario o paciente.

9.1. Seguridad cibernética

El software LeukoStrat CDx *FLT3* Software no requiere conexión de red para su funcionamiento. Para reducir al mínimo los riesgos de seguridad cibernética, se recomienda utilizar el software en un equipo independiente que no esté conectado a ninguna red. Se recomienda tomar las siguientes medidas si se utiliza un equipo conectado a la red para alojar el software.

- Los equipos informáticos y las redes son vulnerables si no se protegen y actualizan de forma activa. Disponer de un buen programa de seguridad para equipos informáticos y redes ayuda a garantizar que los datos no se vean expuestos, se pierdan ni se dañen como consecuencia de riesgos cibernéticos evitables. Equipe todos sus equipos informáticos con un software antivirus, que debe estar actualizado y activo.
- Filtre y asegure el tráfico de red con un *firewall*.
- Conserve los datos en equipos locales para reducir los riesgos de seguridad cibernética que podrían presentarse al transferir datos sensibles a través de la red.
- Instale el software solo para cuentas de usuarios locales sin privilegios de administrador para evitar el uso no autorizado del software.
- Asegúrese de que Windows y Adobe Acrobat Reader estén siempre actualizados con los últimos parches de seguridad disponibles.
- Elimine cualquier software no esencial del ordenador y deshabilite el acceso al navegador web.
- Asegúrese de que el sistema operativo del equipo se bloquee después de cierto tiempo de inactividad del usuario (por ejemplo, 5 minutos).
- Instale solo actualizaciones que se hayan obtenido directamente del fabricante (es decir, Invivoscribe Inc.). La instalación de actualizaciones de seguridad sigue el mismo proceso que la instalación del software.
- Se recomienda hacer una copia de seguridad de la instalación del software y de cualquier resultado que genere el software para evitar la pérdida de datos.
- Asegúrese de que el lector de PDF predeterminado de Windows sea Adobe Acrobat Reader. Abrir los informes de muestras y ejecución en un navegador podría generar riesgos de seguridad cibernética para los datos de los pacientes.
- El software LeukoStrat CDx *FLT3* Software se ha validado con los siguientes softwares antivirus:
 - Symantec Endpoint Protection Version 14.3
 - McAfee Endpoint Security Version 10.7
 - ESET Endpoint Security Version 10.0

10. Recogida y preparación de las muestras

10.1. Precauciones

- Las muestras biológicas procedentes de seres humanos pueden contener materiales posiblemente infecciosos. Manipule las muestras de acuerdo con el programa sobre patógenos de transmisión hemática de su centro y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.
- Este dispositivo se ha validado para su uso con sangre y médula ósea anticoaguladas con heparina sódica o EDTA.

10.2. Sustancias que pueden afectar a la PCR

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

10.3. Requisitos y manipulación de las muestras

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

11. Procedimiento de la prueba

11.1. Inspección de la muestra

- 11.1.1. Desembale las muestras de sangre periférica (SP) y aspirado de médula ósea (MO) y deseche las muestras que no se ajusten a los requisitos indicados el apartado 10.3.

11.2. Preparación para el procesamiento de la muestra

- 11.2.1. Procese la muestra en un espacio de trabajo reservado para dicha tarea.
- 11.2.2. Pipetee unos 14 mL del medio RPMI-1640 en cada tubo cónico de 50 mL. Deje que el medio alcance la temperatura ambiente durante al menos 1,75 horas.
- Si el medio RPMI-1640 se vierte frío a los tubos cónicos de 15 mL, déjelo a temperatura ambiente durante al menos 45 minutos.
- 11.2.3. Pipetee 3 mL del gradiente de densidad por muestra en tubos cónicos de 15 mL.
- Si el gradiente de densidad se ha conservado a entre 2 °C y 8 °C, déjelo 1 hora a temperatura antes de usarlo.
- 11.2.4. Pipetee unos 200 µL de la SSAFD por muestra en tubos del volumen que corresponda y déjelos a temperatura ambiente durante al menos 45 minutos antes de usarlos.

11.3. Dilución de las muestras clínicas

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

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

11.4. Aislamiento de células mononucleares (CMN)

- 11.4.1. Pipetee la muestra diluida de sangre periférica o de médula ósea sobre el gradiente de densidad. Incline el tubo que contiene el gradiente de densidad mientras pipetea lentamente para evitar que se mezclen las capas.
- 11.4.2. Tras pipetear toda la muestra, coloque el tubo en posición vertical y ciérrelo bien.
- 11.4.3. Centrifugue los tubos cónicos de 15 mL en las siguientes condiciones; asegúrese de que el freno esté desconectado:
- Fuerza = 400 × g (RCF)
 - Tiempo = 30 minutos

- Temperatura = 20 °C
 - Aceleración/deceleración = mínimas
- 11.4.4. Pipetee 6 mL del medio RPMI-1640 en un tubo cónico de 15 mL por cada muestra por procesar.
- 11.4.5. Tras la centrifugación, utilice una pipeta para aspirar lentamente la capa de CMN o hasta extraer 3 mL.
- 11.4.6. Dispense la suspensión de CMN procedente del tubo cónico de 15 mL que contiene 6 mL del medio RPMI-1640. Tape el tubo y mezcle suavemente invirtiéndolo entre 3 y 5 veces.
- 11.4.7. Centrifugue los tubos cónicos en las siguientes condiciones:
- Fuerza = 355-364 × g (RCF)
 - Tiempo = 10 minutos
 - Temperatura = 20 °C
 - Aceleración/deceleración = máximas
- 11.4.8. Vierta el sobrenadante del sedimento celular invirtiendo el tubo solo una vez antes de devolverlo a la posición vertical. Vuelva a suspender el sedimento en el líquido restante golpeando suavemente el tubo de 10 a 15 veces o hasta que el sedimento se vuelva a suspender.
- 11.4.9. Añada 1 mL del medio RPMI-1640 al sedimento de células resuspendido. Tape el tubo y mezcle suavemente golpeando con los dedos de 6 a 8 veces.
- 11.4.10. Coloque los tubos con las muestras en un baño de agua con hielo hasta que hayan finalizado los recuentos de células mononucleares.

11.5. Recuento de células mononucleares

- 11.5.1. Obtenga los recuentos de las células mononucleares utilizando un sistema de recuento adecuado.
- 11.5.2. Reduzca al mínimo el volumen consumido para realizar los recuentos, a fin de garantizar que se mantiene una cantidad de ADN adecuada para la prueba.
- Elimine la muestra utilizada para el recuento celular.

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

- 11.6.1. Si la concentración indicada es ≤ 5 millones de células/mL, procese todo el volumen de suspensión celular. Consulte el apartado 11.6.3.
- 11.6.2. Si la concentración indicada es >5 millones de células/mL, calcule un volumen de muestra que contenga 5 millones de células vivas (V_i); las columnas de QIAcube tienen capacidad para ≤ 5 millones de células.
- 11.6.2.1. Utilice la ecuación $C_i V_i = C_f V_f$ para calcular V_i en cada muestra.
- C_i = concentración de células (células/mL) a partir del recuento de CMN
 - C_f = concentración final (5 millones de células/mL)
 - V_f = volumen final (1 mL)
 - $V_i = \frac{5\,000\,000 \frac{\text{células}}{\text{mL}} \times 1 \text{ mL}}{C_i}$
- 11.6.2.2. Utilice la ecuación $V_f - V_i$ para calcular el volumen del medio RPMI-1640 que se debe añadir a V_i para enrasar a 1000 μL .
- 11.6.2.3. Mezcle los tubos que contienen las muestras de >5 millones de células/mL dando de 6 a 8 golpecitos en los tubos.
- 11.6.2.4. Transfiera los volúmenes calculados a un tubo cónico de 15 mL por muestra.
- 11.6.3. Centrifugue los tubos de muestra cónicos de 15 mL que contienen las suspensiones celulares en las siguientes condiciones:
- Fuerza = 355-364 × g (RCF)
 - Tiempo = 10 minutos
 - Temperatura = 20 °C
 - Aceleración/deceleración = máximas
- 11.6.4. Utilice una pipeta de transferencia para aspirar el sobrenadante del sedimento celular. Podrían quedar restos del medio.
- 11.6.5. Golpee suavemente los tubos cónicos de 15 mL entre 10 y 15 veces o hasta que el sedimento se haya soltado.
- 11.6.6. Añada 200 μL de la SSAFD y mezcle golpeando el tubo de 10 a 15 veces para resuspender las células. Tape las muestras e introdúzcalas en el baño de agua con hielo.

11.7. Preparación de la estación de automatización QIAcube

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

- 11.7.1. Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento que figuran en el manual del fabricante de la estación de automatización QIACube, a menos que se indique lo contrario a continuación.
 - 11.7.1.1. Siga las instrucciones de QIAGEN para proceder con el mantenimiento de la estación de automatización QIACube, con la siguiente excepción: realice la prueba de estanqueidad una vez al mes en lugar de cada seis meses.
- 11.7.2. Prepare la estación de automatización QIACube para su uso cargando los materiales y reactivos necesarios.
 - 11.7.2.1. La QIACube es capaz de procesar hasta 12 tubos. Sin embargo, uno de los espacios se reserva al control de extracción (utilizado como control de contaminación de extracción y control negativo de la PCR). No podrá procesar 1 ni 11 tubos por desequilibrio de la centrifuga.
 - 11.7.2.2. Pueden utilizarse tubos blancos (con la SSAFD) si el número de extracciones necesarias, incluido el control de extracción, es de 11 tubos.
- 11.7.3. Saque un tubo del control de extracción (CE), que debería estar almacenado a entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, y descongélelo a temperatura ambiente. Los tubos de CE pueden volver a meterse en el congelador tras usarse. Anote el número de ciclos de congelación y descongelación.
- 11.7.4. Introduzca el tubo de CE en el agitador vorticial y agite a velocidad máxima durante 5-15 segundos. Centrifugue el tubo durante 2-5 segundos si hay líquido en la tapa. Introduzca 200 μL del control de extracción en un tubo de muestras. El tubo que contiene el CE puede taparse y conservarse a entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que el desarrollo esté listo.

11.8. Extracción del ADN

NOTA: El manual recoge las instrucciones de uso del equipo QIACube de extracción de ADN. Se recomienda usar un equipo QIACube, pero no es obligatorio. La extracción del ADN puede realizarse con el minikit de ADN en sangre Qiagen DSP, sin que sea necesario el equipo QIACube.

- 11.8.1. Pipete la suspensión celular (consulte el apartado 11.6.6) hacia arriba y hacia abajo entre 4 y 6 veces para resuspender las células. Transfiera la suspensión celular de la SSAFD a los tubos de muestras. Asegúrese de que la mayor parte de la solución se encuentre en el fondo del tubo.
- 11.8.2. Coloque el tubo que contiene la muestra de control de extracción en la última posición del desarrollo.
- 11.8.3. Cargue los demás tubos de muestras, los reactivos y la solución que contiene la proteasa en el equipo.
- 11.8.4. Inicie el desarrollo y asegúrese de seleccionar los siguientes parámetros.
 - 11.8.4.1. Utilice el protocolo del minikit de ADN en sangre Qiagen DSP.
 - 11.8.4.2. Seleccione **Blood** (Sangre) o **Body fluid** (Humor corporal) como material inicial.
 - 11.8.4.3. Ajuste el *Elution volume* (Volumen de elución) en **100 μL** .
- 11.8.5. Cuando haya finalizado la extracción, tape los tubos de muestras de ADN y consérvelos a entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se haya realizado la cuantificación.

11.9. Cuantificación y dilución del ADN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11.10. Amplificación

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

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

NOTA: Reduzca al mínimo el tiempo durante el que la Taq no esté a entre -30 °C y -15 °C.

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

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

- 11.10.3. Determine el número de pocillos (muestras, controles positivos para DTC, controles positivos para DIT, controles de la extracción y control sin molde) que debe analizarse en las placas para DIT y DTC. El número de pocillos que debe analizarse por cada placa para DIT o DTC = X. Para evitar variaciones al pipetear volúmenes de reactivo pequeños, el valor mínimo de X es dos (2).
 - 11.10.3.1. Calcule los volúmenes de mezcla maestra y Taq necesarios:
 - Volumen total de mezcla maestra = $45 \mu\text{L} \times (X + 3)$
 - Volumen total de Taq = $0,2 \mu\text{L} \times (X + 3)$
 - Las tres (3) muestras adicionales añadidas a X compensan los errores de pipeteo.
- 11.10.4. Introduzca los tubos de muestras maestras, controles y muestras de ADN en el agitador vorticial y agite a velocidad máxima durante 5-15 segundos.
- 11.10.5. Saque la Taq del lugar de conservación, que debe estar a entre -30 °C y -15 °C. No use el agitador vorticial.
- 11.10.6. Utilice la microcentrífuga para centrifugar todos los tubos (incluido el de Taq) entre 2 y 5 segundos y eliminar el líquido de las tapas.
- 11.10.7. Vierta los volúmenes correspondientes de la mezcla maestra y Taq en tubos del volumen que corresponda para las placas de DIT y DTC.
- 11.10.8. Tape y agite los tubos con el agitador vorticial a velocidad máxima entre 5 y 15 segundos para mezclar su contenido. Utilice una microcentrífuga para centrifugar entre 2 y 5 segundos, cuando sea posible. Coloque la Taq en el lugar de conservación, que debe estar a entre -30 °C y -15 °C.
- 11.10.9. Pipetee $45 \mu\text{L}$ de la mezcla maestra y Taq en los pocillos correspondientes de la placa para PCR.
- 11.10.10. Añada $5 \mu\text{L}$ de las muestras de ADN a $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y los controles a los pocillos correspondientes de la placa de 96 pocillos, de acuerdo con el esquema de la placa para PCR.
- 11.10.11. Selle las columnas de la placa para PCR con las tiras de pocillos. Centrifugue la placa de 96 pocillos a $1400 \times g$ durante 1 minuto.
- 11.10.12. Coloque la placa para PCR en un termociclador Veriti Dx y cierre la tapa. Programe el termociclador según se indica en la Tabla 5.

Tabla 5: Programas del termociclador de amplificación por PCR

Paso	Programa CDx para DIT en <i>FLT3</i>	Programa CDx para DTC en <i>FLT3</i>
1	95 °C durante 11 minutos	94,5 °C durante 11 minutos
2	94 °C durante 30 segundos	93,5 °C durante 30 segundos
3	57 °C durante 60 segundos	56,5 °C durante 60 segundos
4	72 °C durante 2 minutos	71,5 °C durante 2 minutos
5	Repita 24 veces los pasos 2-4	Repita 28 veces los pasos 2-4
6	94 °C durante 30 segundos	93,5 °C durante 30 segundos
7	60 °C durante 45 minutos	59,5 °C durante 45 minutos
8	4 °C ∞	4 °C ∞
Velocidad de la rampa: 75 %.		

- 11.10.13. Pulse **Run** (Desarrollar) para ver la siguiente pantalla. Asegúrese de que el ajuste del volumen de la reacción sea de 50 µL, de que el ajuste de la temperatura sea de 105,0 °C y de que la cubierta se caliente antes del desarrollo. Pulse **Start Run Now** (Iniciar desarrollo) para iniciar el desarrollo.
- 11.10.14. Guarde los reactivos y el ADN sobrantes. Conserve las mezclas maestras abiertas a entre -30 °C y -15 °C. Anote el número de ciclos de congelación y descongelación.
- 11.10.15. Tras finalizar el protocolo de PCR, puede almacenar la placa para PCR a entre 2 °C y 8 °C hasta 72 horas. Por lo que respecta a las placas para DTC, continúe con el apartado 11.11: *Digestión con la enzima de restricción (solo para mutados en el DTC)*. Por lo que respecta a las placas para DIT, continúe con el apartado 11.12, *Detección mediante electroforesis capilar*.

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

- NOTA:** Siga las instrucciones que figuran en este apartado el mismo día.
- NOTA:** Realice la digestión con la enzima de restricción solo en los amplicones del DTC.
- NOTA:** Reduzca al mínimo el tiempo durante el que la EcoRV no esté a entre -30 °C y -15 °C.

- 11.11.1. Descongele a temperatura ambiente uno de los tubos de la solución amortiguadora NEBuffer r3.1.
- 11.11.2. Mientras que los reactivos alcanzan la temperatura ambiente, anote en una placa de 96 pocillos para la digestión del DTC un identificador único.
- 11.11.3. Determine el número de pocillos de la placa (muestras y controles) que debe digerirse. El número total de muestras que debe digerirse = Y.
- Para evitar variaciones al pipetear volúmenes de reactivo pequeños, el valor mínimo de Y es cuatro (4).
- 11.11.3.1. Calcule los volúmenes necesarios de NEBuffer r3.1 y EcoRV.
- Volumen total de NEBuffer r3.1 = $1,1 \mu\text{L} \times (Y + 6)$
 - Volumen total de EcoRV = $0,5 \mu\text{L} \times (Y + 6)$
 - Las seis (6) muestras adicionales añadidas a Y compensan los errores de pipeteo.
- 11.11.4. Introduzca el tubo de la solución NEBuffer r3.1 en el agitador vorticial y agite a velocidad máxima durante 5-15 segundos.
- 11.11.5. Saque la enzima EcoRV del lugar de almacenamiento, que debe estar a entre -30 °C y -15 °C. No use el agitador vorticial.
- 11.11.6. Utilice la microcentrífuga para centrifugar todos los tubos (incluido el de EcoRV) entre 2 y 5 segundos y eliminar el líquido de las tapas.
- 11.11.7. Añada los volúmenes calculados de NEBuffer r3.1 y EcoRV a un tubo del volumen que corresponda.
- 11.11.8. Pipetee arriba y abajo de 5 a 10 veces para mezclar la solución. Vuelva a introducir la EcoRV en el lugar de conservación, que debe estar a entre -30 °C y -15 °C.
- 11.11.9. Pipetee 1,5 µL de la mezcla para digestión en los pocillos que corresponda de la placa para digestión.
- 11.11.10. Saque la placa para PCR para DTC del termociclador o del lugar de conservación, que debe estar a entre 2 °C y 8 °C (no es necesario que se alcance la temperatura ambiente) y centrifugue la placa a 1400 × g durante 1 minuto.
- 11.11.11. Pipetee 8,5 µL de las muestras de la placa para PCR en los pocillos que corresponda de la placa para digestión. Selle las columnas de la placa para digestión con tiras protectoras.
- 11.11.12. Centrifugue la placa a 1400 × g durante 1 minuto.
- 11.11.13. Coloque la placa de digestión en un termociclador Veriti Dx y cierre la tapa.

- 11.11.14. Programe el termociclador según se indica a continuación (velocidad de la rampa: 75 %).
- Etapa 1: 37 °C durante 1 hora
 - Etapa 2: 65 °C durante 10 minutos
 - Etapa 3: 4 °C durante ∞
- 11.11.15. Pulse **Run** (Desarrollar) para ver la siguiente pantalla. Asegúrese de que el ajuste del volumen de la reacción sea de 10 µL, de que el ajuste de la temperatura sea de 105,0 °C y de que la cubierta se caliente antes del desarrollo. Pulse **Start Run Now** (Iniciar desarrollo) para iniciar el desarrollo.
- 11.11.16. Tras finalizar el protocolo de digestión, la placa para digestión puede guardarse al abrigo de la luz a entre 2 °C y 8 °C durante 72 horas como máximo. De lo contrario, continúe con el apartado 11.12, *Detección mediante electroforesis capilar*.

11.12. Detección mediante electroforesis capilar

- NOTA:** Reduzca al mínimo el tiempo de conservación del patrón de tamaño LIZ a temperaturas distintas de entre 2 °C y 8 °C.
- NOTA:** El 3500xL y el 3500xL Dx desarrollan conjuntos de 24 capilares en cada inyección, compuestas por tres (3) columnas de ocho (8) filas en placas de 96 pocillos. Cada capilar se corresponde con un pocillo. No ofrece inyecciones parciales, aunque las inyecciones pueden programarse de manera independiente.

- 11.12.1. Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento que figuran en el manual del fabricante del 3500xL y el 3500xL Dx, a menos que se indique lo contrario a continuación.
- 11.12.2. Las pruebas de DIT y DTC deben desarrollarse mediante distintas inyecciones y con diferentes condiciones de inyección. Las condiciones relativas a DIT y DTC del 3500xL y el 3500xL Dx se indican en la Tabla 6, que se recoge a continuación. Estos ajustes están incluidos en los archivos XML suministrados, que pueden importarse a los instrumentos y guardarse en el ABI 3500xL y 3500xL Dx para usos futuros.

Tabla 6: Condiciones aplicables al analizador genético 3500xL y 3500xL Dx

Parámetro	Parámetros aplicables a la prueba CDx para DIT	Parámetros aplicables a la prueba CDx para DTC
Tiempo de inyección	12 s	7 s
Tensión de la inyección	1,2 kV	1,0 kV
Longitud del capilar	50 cm	
Polímero	POP-7	
Colorantes	G5	
Temperatura del horno	60 °C	
Tiempo de desarrollo	1630 s	
Tensión del desarrollo	19,5 kV	
Tiempo previo al desarrollo	180 s	
Tensión previa al desarrollo	15 kV	
Retraso de datos	1 s	

- 11.12.3. Haga clic en **Refresh** (Actualizar) para actualizar el tiempo de los fungibles en el instrumento y el número de inyecciones realizadas en el panel del 3500xL o del 3500xL Dx. Revise el panel del 3500xL o el 3500xL Dx y asegúrese de que las soluciones amortiguadoras, el polímero y los capilares no hayan pasado más tiempo del permitido en el equipo de esta prueba, que se indica en la Tabla 7. Revise que el número de muestras (no solo de inyecciones) restantes para POP-7 sea suficiente para el desarrollo. Si debe cambiar alguno de los fungibles, lleve a cabo las tareas de mantenimiento necesarias antes de proceder.

Tabla 7: Tiempo máximo admisible del material en el 3500xL o el 3500xL Dx

Material en el 3500xL (Dx)	Tiempo máximo admisible en el equipo
Polímero POP-7	7 días
Amortiguador anódico	7 días
Amortiguador catódico	7 días
Matriz del capilar del 3500xL o Matriz del capilar del 3500xL Dx	400 inyecciones o 160 inyecciones

11.13. Preparación de la solución patrón, si es necesaria

- 11.13.1. La solución patrón es una mezcla de patrones de tamaño LIZ y formamida Hi-Di.
- 11.13.2. Saque un tubo de la solución patrón del lugar de conservación, que debe estar a entre 2 °C y 8 °C, y continúe con el apartado 11.13.6. Si no tiene, elabore la solución patrón siguiendo las instrucciones que figuran a continuación.
- 11.13.3. Descongele a temperatura ambiente un frasco de formamida Hi-Di. Saque un tubo del patrón de tamaño LIZ del lugar de conservación.
- 11.13.4. Introduzca los tubos en el agitador vorticial y agite velocidad máxima durante 5-15 segundos. Centrifugue los tubos durante 2-5 segundos en una microcentrífuga.
- 11.13.5. Pipetee 56 µL del patrón de tamaño LIZ en 1 mL de formamida Hi-Di. Anote en el tubo de la solución patrón la fecha de elaboración.
- 11.13.6. Introduzca el tubo de solución patrón en el agitador vorticial y agite a velocidad máxima durante 5-15 segundos. Centrifugue el tubo de la mezcla durante 2-5 segundos en una microcentrífuga. Puede conservar los restos no utilizados a entre 2 °C y 8 °C hasta 7 días. Elimínelos transcurridos 7 días.

11.14. Preparación de la placa de muestras

- 11.14.1. Centrifugue la placa de 96 pocillos para PCR para DIT y de digestión para DTC a 1400 ×g durante 1 minuto.
- 11.14.2. Anote un identificador único en la placa de 96 pocillos para EC para DIT y para EC para DTC que corresponda.

NOTA: Pueden desarrollarse pruebas para DIT y DTC en la misma placa, pero deben incluirse en inyecciones distintas.

- 11.14.3. Determine el número de pocillos necesarios por desarrollo.
 - Número de pocillos = 24 X
 - X = el número de inyecciones.
 - Calcule el volumen de solución patrón necesario.
 - Volumen máximo de la solución patrón = 9,5 µL × (24 X + 4)
 - Las cuatro (4) muestras adicionales añadidas a X compensan los errores de pipeteo.
- 11.14.4. Añada 9,5 µL de la solución patrón a los pocillos de la placa para EC que contiene las muestras. Añada 9,5 µL de la solución patrón o de la formamida Hi-Di a los pocillos restantes sujetos a inyección (múltiplo de 24) que no contengan muestras.

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

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

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

- 11.14.6. Selle la placa para EC con una lámina de aluminio y centrifugue a 1400 × g durante 1 minuto.
- 11.14.7. Coloque la placa de electroforesis capilar en un termociclador Veriti Dx y cierre la tapa.
- 11.14.8. Programe el termociclador según se indica a continuación (velocidad de la rampa: 75 %).
 - Etapa 1: 95 °C durante 3 minutos
 - Etapa 2: 4 °C durante 5 minutos
- 11.14.9. Pulse **Run** (Desarrollar) para ver la siguiente pantalla. Asegúrese de que el ajuste del volumen de la reacción sea de 10 µL, de que el ajuste de la temperatura sea de 105,0 °C y de que la cubierta se caliente antes del desarrollo. Pulse **Start Run Now** (Iniciar desarrollo) para iniciar el desarrollo.
- 11.14.10. Una vez finalizado el desarrollo, asegúrese de que no haya burbujas revisando visualmente los pocillos de las placas. Retire las burbujas existentes centrifugando la placa para EC a 1400 × g durante 1 minuto.
- 11.14.11. Coloque la placa para EC sobre la base de 96 pocillos del equipo 3500xL o 3500xL Dx y asegúrese de que coincidan las esquinas con muescas. Retire la lámina de aluminio y coloque una membrana de goma para placas de 96 pocillos sobre la placa; asegúrese de que la membrana quede plana y de que las aberturas no estén obstruidas. Coloque un retenedor para las placas de 96 pocillos del equipo 3500xL o 3500xL Dx.

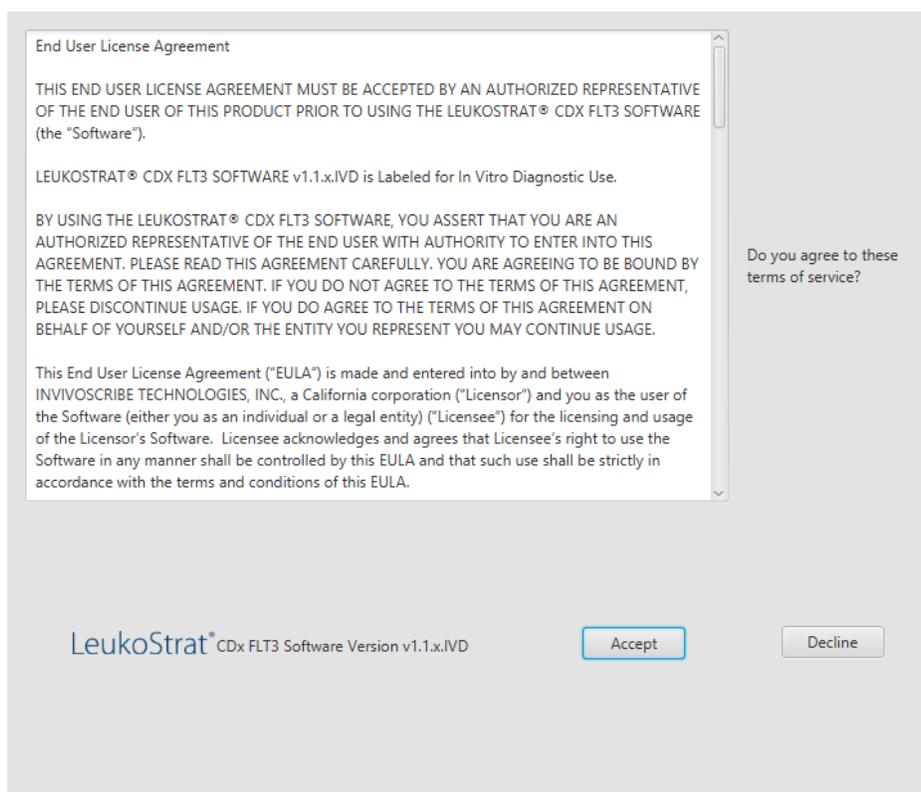
11.15. Configuración de PlateMapper con el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software

NOTA: Permiso de administrador es requerido para instalar el LeukoStrat® CDx *FLT3* Software.

11.15.1. Instale el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software.

- 11.15.1.1. Copie el archivo de instalación *LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi* del CD del software en la unidad local de su equipo.
- 11.15.1.2. Haga doble clic en el archivo **LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi**.
 - 11.15.1.2.1. Si aparece un mensaje de *SmartScreen de Microsoft Defender* al hacer doble clic en el archivo msi, haga clic en **More info** (Más información).
 - 11.15.1.2.2. Compruebe que el editor es Invivoscribe, Inc. Para continuar con la instalación, haga clic en **Run anyway** (Ejecutar de todos modos).
- 11.15.1.3. Aparecerá el asistente de instalación de *LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi*. Haga clic en **Next** (Siguiente).
- 11.15.1.4. La ubicación de instalación predeterminada es *C:\Invivoscribe\LeukoStratCDx-1.1.x.IVD*. Haga clic en **Next** (Siguiente).
- 11.15.1.5. Haga clic en **Install** (Instalar). La instalación comenzará.
- 11.15.1.6. Aparecerá el cuadro de diálogo *User Account Control* (Control de la cuenta del usuario). Haga clic en **Yes** (Sí).
- 11.15.1.7. Para salir del asistente de instalación, haga clic en **Finish** (Finalizar).

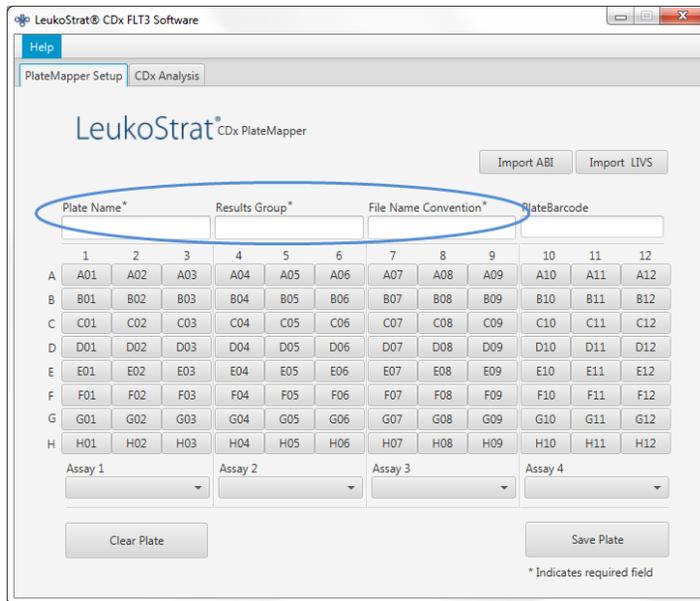
- 11.15.2. Abra el software *LeukoStrat CDx FLT3* Software. Haga clic en **Accept** (Aceptar) () para aceptar los términos del servicio.



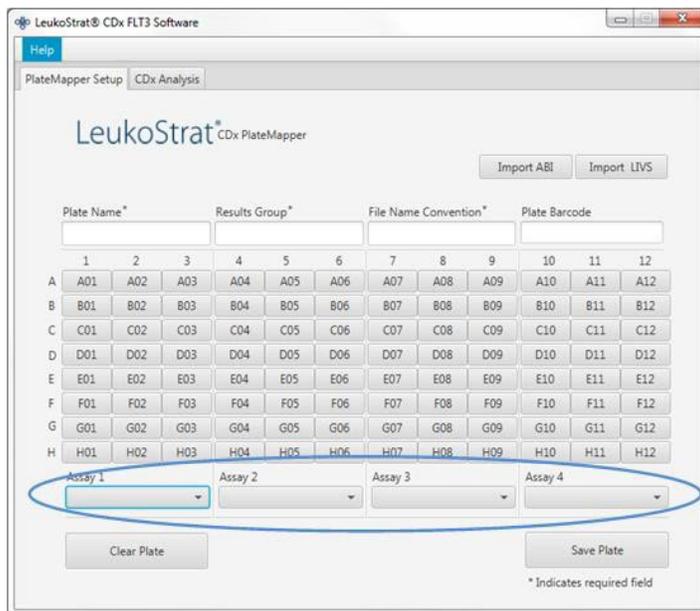
11.15.3. En *PlateMapper Setup* (Configuración de PlateMapper), rellene los tres campos obligatorios, que encontrará sobre el mapa de la placa. Los campos obligatorios son *Plate Name* (Nombre de la placa), *Results Group* (Grupo de resultados) y *File Name Convention* (Convención del nombre del archivo) (se han rodeado con un círculo).

11.15.3.1. Los nombres del mapa de la placa solo pueden contener 50 caracteres y deben estar formados por [A-Z, a-z, 0-9], espacios únicos y guiones.

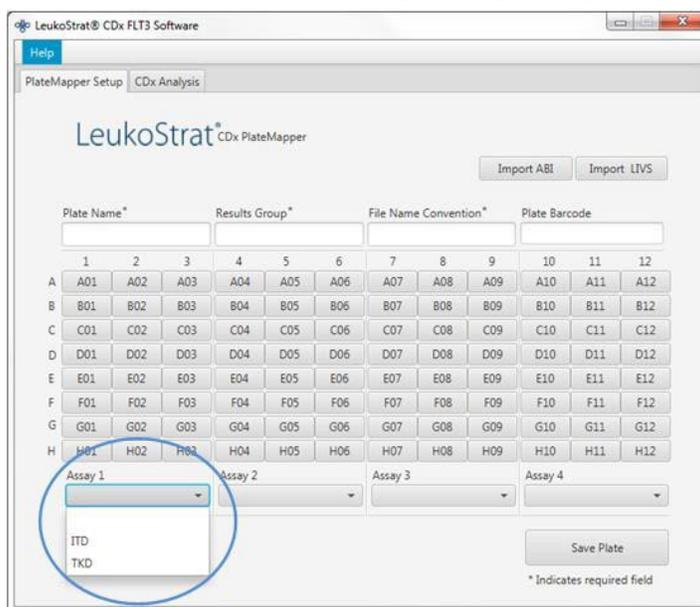
11.15.3.2. Los datos que introduzca en *Results Group* (Grupo de resultados) y *File Name Convention* (Convención del nombre del archivo) deben coincidir con los que el usuario haya introducido en el 3500xL o 3500xL Dx (consulte el apartado 11.16.14).



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



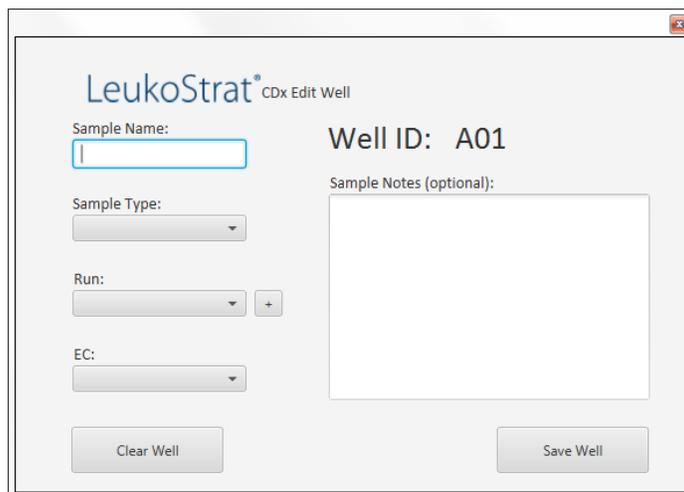
11.15.5. Seleccione la prueba en cuestión en el menú desplegable (), que se corresponde con las muestras que encontrará justo encima, en la pantalla *PlateMapper Setup* (Configuración de PlateMapper).



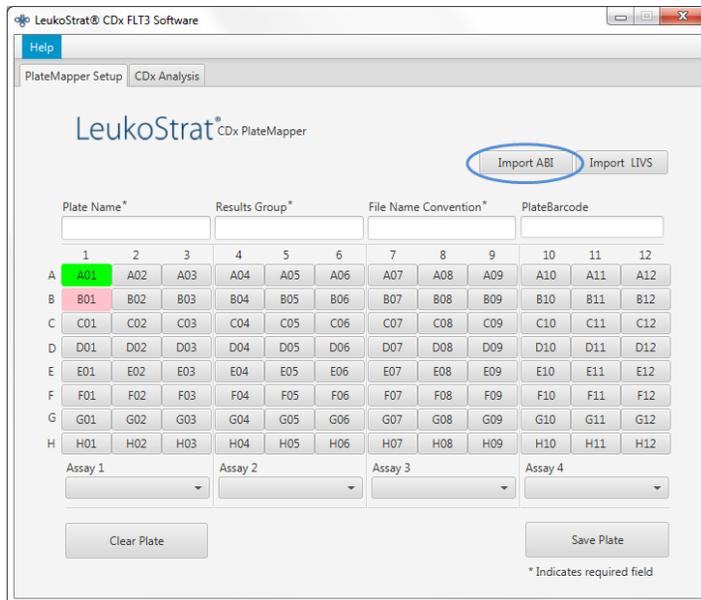
11.15.6. Introduzca, en el mapa de la placa, los datos de cada pocillo que contendrá una muestra o un control para analizar.

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

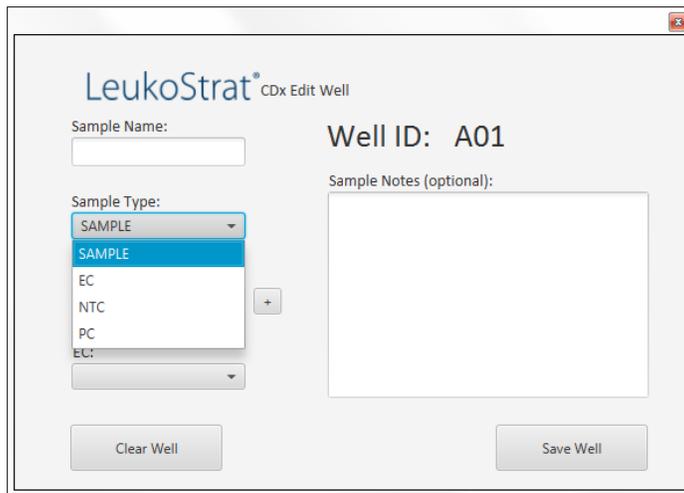
11.15.6.1. Para introducir datos, haga clic en el pocillo que corresponda (*p. ej.*, A01) y se abrirá el siguiente cuadro:



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

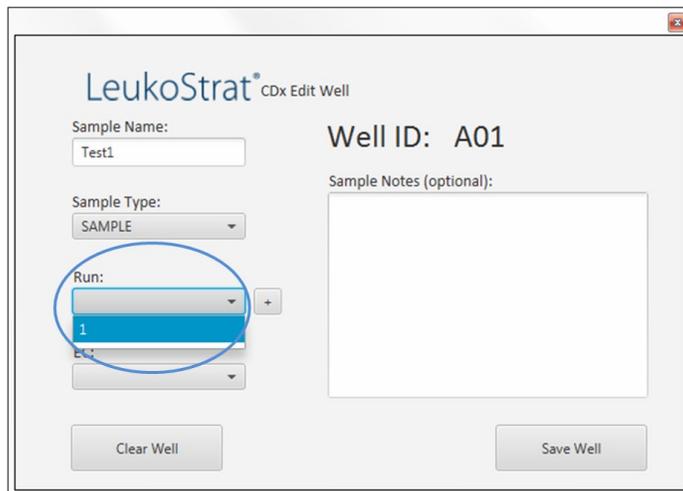


- 11.15.8. Seleccione el **Sample Type** (Tipo de muestra) de cada pocillo en el menú desplegable. Las opciones que puede seleccionar son:
- SAMPLE (MUESTRA) = Desconocida
 - EC (CE) = Control de extracción
 - NTC (CSM) = Control sin molde
 - PC (CP) = Control positivo

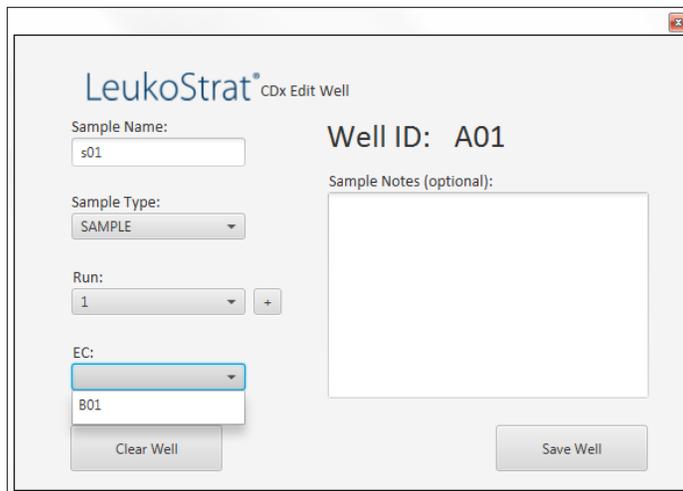


11.15.9. Seleccione el **Run Number** (Número de desarrollo) en el menú desplegable. Para añadir un nuevo número de desarrollo, haga clic en +, que encontrará junto al menú desplegable.

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



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



11.15.10. En el campo *Sample Notes* (Notas de la muestra), pueden introducirse comentarios adicionales sobre la muestra o el control. Estos comentarios aparecerán en el *Sample Report* (Informe de la muestra).

- 11.15.11. Una vez que se hayan introducido los datos sobre el pocillo, haga clic en **Save Well** (Guardar pocillo) para guardar. Para borrar el contenido del pocillo, haga clic en **Clear Well** (Borrar pocillo).

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

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

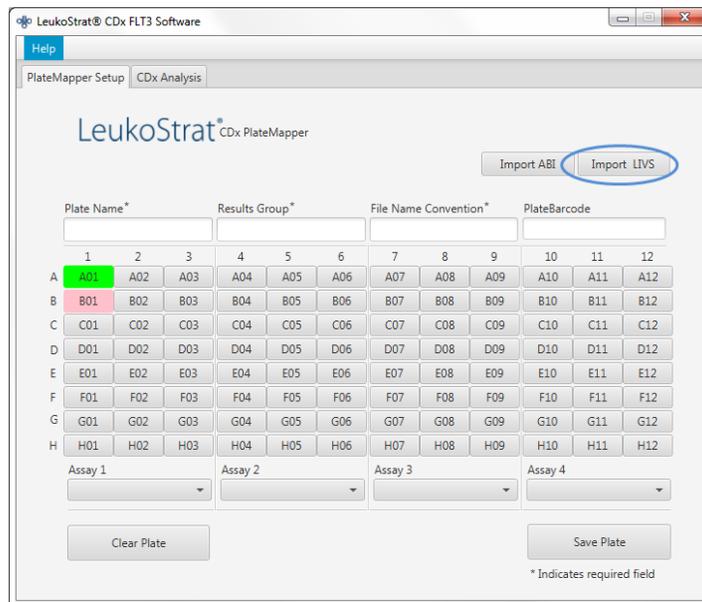
- 11.15.13. Para continuar, introduzca los datos de cada pocillo en la pantalla *PlateMapper Setup* (Configuración de PlateMapper) hasta que todos los pocillos estén resaltados en verde.
- 11.15.14. Cuando haya introducido los datos de todos los pocillos, haga clic en **Save Plate** (Guardar placa) y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

NOTA: No modifique el archivo ABI que genera el software LeukoStrat CDxFLT3 Software. Si lo hace, se producirá un error al cargarlo en el equipo 3500xL o 3500xL Dx.

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

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

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



- 11.15.15. El software seguirá activo tras el fin del desarrollo en el equipo 3500xL o 3500xL Dx.
- 11.15.16. Utilice el archivo ABI que genere el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software para cargar la placa en el 3500xL o 3500xL Dx.
- 11.15.17. Si se produce algún error al guardar la placa, siga las recomendaciones que figuran en la Tabla 8. Si necesita asistencia adicional, póngase en contacto con el servicio técnico de Invivoscribe a través de support@invivoscribe.com.

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

Mensaje de error al guardar la placa [código]	Posibles causas	Acciones correctivas
<ul style="list-style-type: none"> <i>Corrupted sample detected</i> (Se ha detectado que la muestra está dañada) [PM01] <i>Could not detect well for object UUID</i> (No se ha detectado el pocillo para el UUID del objeto) [PM02] <i>Control detected unknown links for well (A-H, 01-12)</i> (El dispositivo de control ha detectado vínculos en el pocillo [A-H, 01-12]) [PM3] 	Se intentó cargar un archivo LIVS modificado.	No modifique el archivo LIVS. Si el archivo está dañado, debe crearse un nuevo archivo LIVS.
<ul style="list-style-type: none"> <i>Missing required field "Plate Name"</i> (No se ha rellenado el campo obligatorio Nombre de la placa) [PM04] <i>Illegal character detected in "Plate Name"</i> (Se ha detectado un carácter no permitido en Nombre de la placa) [PM05] <i>Multiple spaces detected in "Plate Name"</i> (Se han detectado varios espacios en Nombre de la placa) [PM06] <i>Plate Name must be 50 characters or less</i> (El nombre de la placa debe tener 50 caracteres como máximo) [PM28] 	No se han seguido las instrucciones de designación de la placa.	El nombre del mapa puede contener hasta 50 caracteres como máximo y debe estar compuesto por [A-Z, a-z, 0-9], espacios únicos y guiones.
<ul style="list-style-type: none"> <i>Missing required field "Result Group"</i> (No se ha rellenado el campo obligatorio Grupo de resultados) [PM07] 	No se han seguido las instrucciones de designación del grupo de resultados.	El grupo de resultados se define en el equipo 3500xL o 3500xL Dx.
<ul style="list-style-type: none"> <i>Missing required field "File Naming Convention"</i> (No se ha rellenado el campo obligatorio Convención del nombre del archivo) [PM08] 	No se han seguido las instrucciones de designación de la convención del nombre del archivo.	La convención del nombre del archivo se define en el equipo 3500xL o 3500xL Dx.
<ul style="list-style-type: none"> <i>Assay not selected for all samples</i> (No se ha seleccionado la prueba aplicable a las muestras) [PM09] <i>Run contains more than 1 Assay type</i> (El desarrollo contiene más de 1 tipo de prueba) [PM10] 	No se han seguido las instrucciones de asignación del tipo de prueba.	Se debe asignar un tipo de prueba a cada pocillo y no puede haber más de un tipo de prueba en cada desarrollo.
<ul style="list-style-type: none"> <i>Sample name not detected for well (A-H, 01-12)</i> (No se ha detectado el Nombre de la muestra del pocillo [A-H, 01-12]) [PM11] <i>Illegal character detected in Sample Name</i> (Se ha detectado un carácter no permitido en Nombre de la muestra) [PM12] <i>Multiple spaces detected in Sample Name</i> (Se han detectado varios espacios en Nombre de la muestra) [PM13] <i>Sample name must be 50 characters or less</i> (El Nombre de la muestra debe tener 50 caracteres como máximo) [PM14] 	No se han seguido las instrucciones de designación de la muestra.	El nombre de la muestra puede contener hasta 50 caracteres y debe estar compuesto por [A-Z, a-z, 0-9], espacios únicos y guiones.
<ul style="list-style-type: none"> <i>Sample Type not selected for well (A-H, 01-12)</i> (No se ha seleccionado el Tipo de muestra para el pocillo [A-H, 01-12]) [PM15] 	No se han seguido las instrucciones de selección del tipo de muestra.	Debe asignarse un tipo de muestra a cada pocillo. Las opciones son <i>PC</i> (CP), <i>NTC</i> (CSM), <i>EC</i> (CE) y <i>SAMPLE</i> (MUESTRA).
<ul style="list-style-type: none"> <i>Run not selected for well (A-H, 01-12)</i> (No se ha seleccionado el desarrollo del pocillo [A-H, 01-12]) [PM16] <i>No Runs created for Plate</i> (No se han creado el desarrollo de la placa) [PM17] 	No se han seguido las instrucciones de selección de los desarrollos.	Debe asignarse un desarrollo a cada pocillo. Tras asignar el primer pocillo a un desarrollo, el usuario tendrá que incrementar la cifra de desarrollos, pulsando el botón "+" situado junto a <i>Run</i> (Desarrollo). Puede incrementarse el número de

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

Mensaje de error al guardar la placa [código]	Posibles causas	Acciones correctivas
		desarrollos o seleccionarse un número de desarrollos anterior.
<ul style="list-style-type: none"> • <i>EC not selected for well (A-H, 01-12)</i> (No se ha seleccionado el CE para el pocillo [A-H, 01-12] [PM18]) • <i>Sample attached to unknown EC for well (A-H, 01-12)</i> (Muestra vinculada a un CE desconocido para el pocillo [A-H, 01-12]) [PM19] • <i>EC selected on control for well (A-H, 01-12)</i> (Se ha seleccionado un CE para el pocillo [A-H, 01-12]) [PM20] • <i>No samples linked to EC for well (A-H, 01-12)</i> (No se han vinculado muestras con el CE del pocillo [A-H, 01-12]) [PM21] 	No se han seguido las instrucciones de asignación de los CE. Se ha intentado cargar un archivo LIVS modificado.	A todos los pocillos del tipo <i>SAMPLE</i> (MUESTRA) se les debe asignar un CE. No asigne CE a los pocillos de control. Cada CE debe vincularse al menos con una muestra.
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Run missing PC, NTC, EC</i> (En el desarrollo faltan el CP, el CSM y el CE) [PM22] • <i>Run detected control in sample list</i> (El desarrollo ha detectado un control en la lista de muestras) [PM23] • <i>Run missing samples</i> (Faltan muestras en el desarrollo) [PM24] • <i>Run contains more than one (1) Assay type</i> (El desarrollo contiene más de un (1) tipo de prueba) [PM25] 	No se han seguido las instrucciones de asignación de los desarrollos. Se ha intentado cargar un archivo LIVS modificado.	En cada desarrollo, debe haber un control de cada tipo (CP, CSM, CE). En cada desarrollo, debe haber al menos un pocillo del tipo <i>SAMPLE</i> (MUESTRA). Cada desarrollo debe contener exactamente un tipo de prueba.
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Too many samples linked to EC for well (A-H, 01-12)</i> (Se han vinculado demasiadas muestras al CE del pocillo [A-H, 01-12]) [PM26] • <i>EC linked to more than one run for well (A-H, 01-12)</i> (Se ha vinculado un CE a más de un desarrollo para el pocillo [A-H, 01-12]) [PM27] 	No se han seguido las instrucciones de asignación de los CE.	Los CE no pueden vincularse a más de 11 muestras. Los CE no pueden vincularse a muestras de distintos desarrollos.

11.16. Configuración del software del equipo 3500xL o 3500xL Dx

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

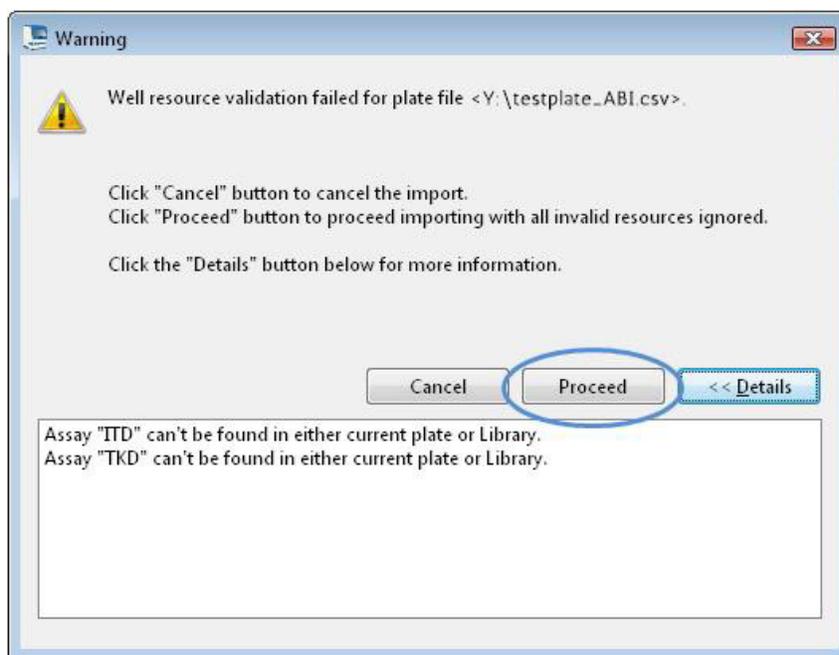
- 11.16.1. Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento que figuran en el manual del fabricante del 3500xL y el 3500xL Dx, a menos que se indique lo contrario a continuación.
- 11.16.2. Si el software de recogida de datos aún no contiene la configuración de la prueba CDx para DIT y la prueba CDx para DTC, importe los archivos que se incluyen con el CD de software adjunto al ABI 3500xL o active el modo IVD del software ABI3500xL Dx de acuerdo con la Guía del usuario del equipo.

NOTA: En el disco del software provisto, hay dos carpetas que contienen archivos .xml: *3500xL RUO Files* y *3500xL Dx Files*; seleccione los archivos que corresponda para importar según el instrumento que se esté utilizando. Intentar importar archivos incorrectos en cualquiera de los instrumentos puede generar un error.

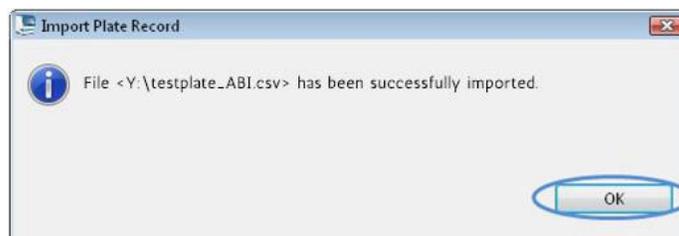
NOTA: Dar el mismo nombre a una prueba, una convención del nombre del archivo o un grupo de resultados en el modo RUO y en el modo IVD del software de recogida de datos del 3500xL Dx puede generar un error. Asegúrese de que no existan nombres que coincidan con los nombres de archivo XML proporcionados en el modo RUO del software de recogida de datos del 3500xL Dx.

- 11.16.3. Haga clic en el botón **Create New Plate** (Crear placa nueva) del panel del 3500xL o 3500xL Dx.
- 11.16.4. Introduzca un descriptor breve del *Plate Name* (Nombre de la placa).
- 11.16.5. Asegúrese de que el número de pocillos se fije en 96.
- 11.16.6. Seleccione **Fragment** (Fragmento) en el menú desplegable para indicar el tipo de placa.
- 11.16.7. Asegúrese de que la longitud del capilar sea de 50 cm y de que el polímero sea *POP7*.
- 11.16.8. Introduzca las iniciales del operario en el apartado *Owner* (Propietario).
- 11.16.9. Haga clic en *Assign Plate Contents* (Asignar el contenido de la placa).

- 11.16.10. Haga clic en el botón **Import** (Importar), situado en la parte superior de la pantalla, y aparecerá una ventana emergente. Acceda al *archivo de importación del 3500xL (Dx)* (archivo ABI) que haya generado el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software. Haga clic en **OPEN** (ABRIR) en la ventana emergente. A continuación, haga clic en **OK** (Aceptar) en la ventana emergente de confirmación de la importación.
- 11.16.10.1. Si no se detectan coincidencias en la biblioteca del 3500xL o 3500xL Dx para el nombre de la prueba (en el archivo ABI), haga clic en **Proceed** (Proceder) en la ventana emergente:



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



- 11.16.12. Una vez completada la importación, en la placa aparecerán los identificadores de las muestras. Asegúrese de que el esquema sea correcto revisando los identificadores de las muestras. Si las muestras no coinciden con la configuración prevista, tendrá que crear un nuevo archivo ABI en el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software y volver a importarlo al ABI 3500xL o 3500xL Dx.

NOTA: No cambie los Sample ID (ID de muestra) en el mapa de la placa 3500xL o 3500xL Dx. Hacerlo daría lugar a error.

- 11.16.13. Confirme las *pruebas* programadas en el 3500xL o 3500xL Dx a través de los parámetros que figuran en la Tabla 6 para la **prueba CDx para DIT** o la **prueba CDx para DTC**.
- 11.16.14. Asigne *Assay (Prueba)*, *Results Group (Grupo de resultados)* y *File Name Convention (Convención del nombre del archivo)* a todos los pocillos que contengan muestras y controles, si es necesario.

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

- 11.16.15. Cargue las placas en el 3500xL.
- 11.16.16. Haga clic en **Link Plate for Run** (Vincular placa para desarrollo). El operario podrá guardar los cambios en la placa. Si debe desarrollar una segunda placa, repita los pasos comprendidos entre el 11.16.2 y el 11.16.15.

11.17. Desarrollo en el analizador genético 3500xL o 3500xL Dx

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

NOTA: En caso de error de conectividad entre el equipo 3500xL o 3500xL Dx y el ordenador que ejecuta el software de recogida de datos, siga las instrucciones para la resolución de problemas del fabricante del instrumento.

- 11.17.4. GeneMapper puede utilizarse para analizar archivos; continúe con el apartado *Análisis de datos con el software GeneMapper* (11.18).

11.18. Análisis de datos con el software GeneMapper

NOTA: Es un requisito utilizar el software *GeneMapper v6.0 con el parche B02* (parche GM_PeakHeight_202110 para el software GeneMapper™ v6.0 instalación completa). El parche debe aplicarse sobre el software GeneMapper; póngase en contacto con el fabricante para recibir el parche y las instrucciones de instalación.

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

- 11.18.1. Asegúrese de usar el *GeneMapper v6.0 con el parche B02*.
 - 11.18.1.1. Para confirmar la versión del parche, abra *GeneMapper v6.0*. Vaya a la pestaña del *Help Menu* (menú Ayuda) y seleccione **About GeneMapper Software 6** (Acerca del software GeneMapper 6). Vea el *Build Id* (ID de compilación) en la ventana emergente *About* (Acerca de).
- 11.18.2. Abra el software *GeneMapper v6.0*.
- 11.18.3. En el *File Menu* (Menú Archivo), seleccione **New Project** (Nuevo proyecto) y **Microsatellite** (Microsatélite). Haga clic en **OK** (Aceptar). Vuelva al *File Menu* (Menú Archivo) y seleccione **Add Samples to Project** (Agregar muestras al proyecto).
- 11.18.4. En el panel izquierdo, navegue hasta los archivos de datos de la carpeta de datos del 3500xL o 3500xL Dx (designada por el *Results Group* [Grupo de resultados]) y haga clic en **Add to List** (Añadir a la lista) para transferirlos al panel derecho. Haga clic en el botón **Add** (Añadir) o **Add & Analyze** (Añadir y analizar).
- 11.18.5. Asegúrese de que el *Analysis Method* (Método de análisis) se haya ajustado al método **Microsatellite** (Microsatélite) y de que el *Size Standard* (Patrón de tamaño) se haya ajustado a **GS600LIZ+Normalization** (GS600LIZ+Normalización) para todas las muestras.

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

- 11.18.6. Asegúrese de que los ajustes del método de análisis estén configurados correctamente. Consulte la Figura 3.
 - 11.18.6.1. Haga clic en **Analysis** (Análisis) y, a continuación, en **Analysis Method Editor** (Editor del método de análisis) en el menú de la parte superior de la pantalla.
 - 11.18.6.2. En la pestaña *Peak Detector* (Detector de picos), asegúrese de que el *Peak Detection Algorithm* (Algoritmo de detección de picos) se fije en **Advanced** (Avanzado).
 - 11.18.6.3. Asegúrese de que en *Peak Amplitude Thresholds* (Umbral de amplitud del pico) se haya introducido **100** para **B** (azul) y **G** (verde), y **50** para los restantes **Y** (amarillo), **R** (rojo), **P** (púrpura) y **O** (naranja). Los canales de los colorantes amarillo y púrpura no se utilizan en LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
 - 11.18.6.4. Asegúrese de que el *Polynomial Degree* (Grado polinómico) se fije en **3** para DIT y en **5** para DTC.
 - 11.18.6.5. Haga clic en **OK** (Aceptar) en la parte inferior de la ventana.

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

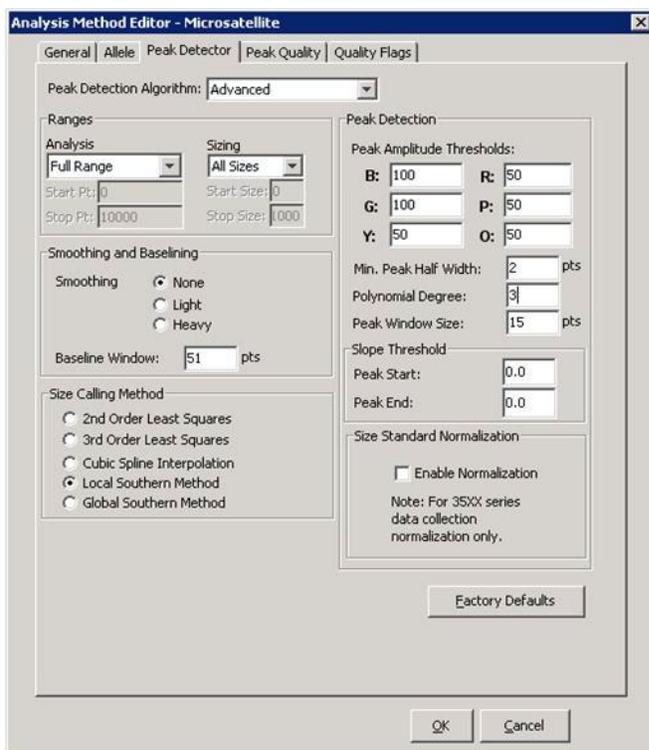


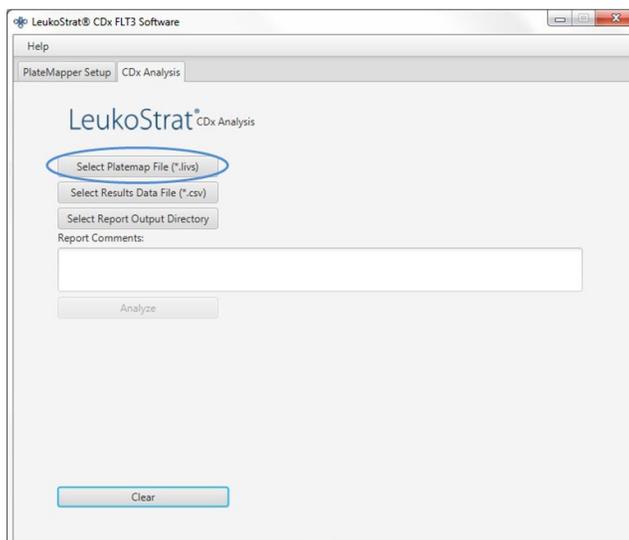
Figura 3. Configuración del método de análisis para DIT. La configuración para DTC es idéntica, con la excepción de que el *Polynomial Degree* (Grado polinómico) se fija en 5.

- 11.18.7. Haga clic en el **botón verde de reproducción** para iniciar el análisis. Guarde el proyecto de GeneMapper con un nombre apropiado.
- 11.18.8. En el software GeneMapper, marque las muestras y los controles y haga clic en el botón **Display Plots** (Mostrar gráficos).
 - 11.18.8.1. En caso de DIT, asegúrese de que se haya seleccionado el icono **Sizing Table** (Tabla de tamaños) y los colorantes azul, verde y rojo para la ventana **Samples Plot** (Gráfico de las muestras).
 - 11.18.8.2. En caso de DTC, asegúrese de que se haya seleccionado el icono **Sizing Table** (Tabla de tamaños) y los colorantes azul y rojo.
- 11.18.9. Asegúrese de que la tabla de debajo del electroferograma contenga las siguientes columnas: **Dye/Sample Peak** (Pico de la muestra/colorante), **Sample File Name** (Nombre del archivo de la muestra), **Size** (Tamaño), **Height** (Altura) y **Area** (Área).
 - 11.18.9.1. Si no, seleccione **Tools** (Herramientas) y a continuación **Plot Settings...** (Ajustes del gráfico...) en el menú **Samples Plot** (Gráfico de las muestras).
 - 11.18.9.2. Seleccione la pestaña **Sizing Table** (Tabla de tamaños) y asegúrese de que los siguientes elementos tengan una marca de verificación verde en la columna **Show** (Mostrar): **Dye/Sample Peak** (Pico de la muestra/colorante), **Sample File Name** (Nombre del archivo de la muestra), **Size** (Tamaño), **Height** (Altura) y **Area** (Área).
 - 11.18.9.3. Haga clic en **OK** (Aceptar).
- 11.18.10. Para exportar la información de la tabla de tamaños, seleccione **File** (Archivo) y, a continuación, **Export Table** (Exportar tabla) del menú **Samples Plot** (Gráfico de las muestras).
 - 11.18.10.1. Introduzca un nombre de archivo y seleccione la ubicación para guardar el archivo.
 - 11.18.10.2. En el menú desplegable **Export File As** (Exportar archivo como), seleccione **Comma-separated values** (Valores separados por comas) (**.csv**).
 - 11.18.10.3. Haga clic en **Export** (Exportar).

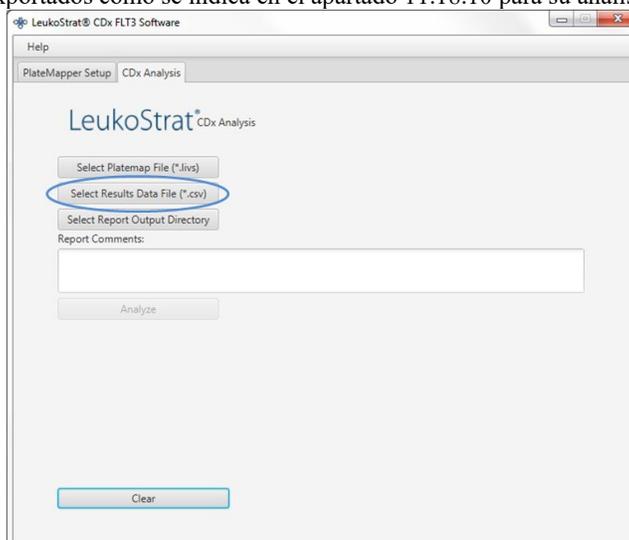
NOTA: No modifique el archivo CSV de ningún modo.

11.19. Análisis de datos con el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software

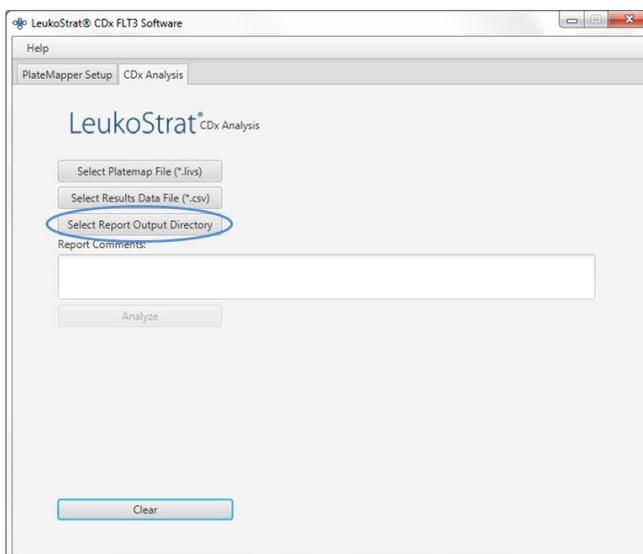
- 11.19.1. Abra el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software, acepte el contrato de licencia y haga clic en la pestaña **CDx Analysis** (Análisis CDx) del software LeukoStrat CDx *FLT3* Software.
- 11.19.2. Haga clic en **Select Platemap File** (Seleccionar archivo del mapa de placa) (***.livs**) y acceda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



11.19.3. Haga clic en **Select Results Data File** (Seleccionar el archivo de datos de resultados) (*.csv) y seleccione uno de los archivos .csv exportados como se indica en el apartado 11.18.10 para su análisis.



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

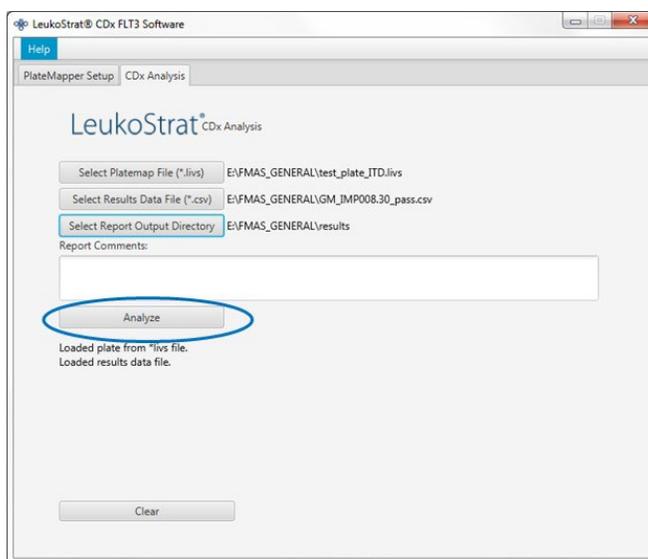


- 11.19.4.1. En el campo *Report Comments* (Comentarios del informe), pueden introducirse comentarios adicionales sobre el desarrollo, las muestras o los controles. Estos comentarios aparecerán en el *Run Report* (Informe del desarrollo).

NOTA: Una vez seleccionados los archivos, no cree ni importe un nuevo *Plate Map* (Mapa de la placa) en la pestaña *PlateMapper Setup* (Configuración de PlateMapper) antes de analizar el desarrollo o los datos actuales. Si modifica de algún modo los datos de la pestaña *PlateMapper Setup* (Configuración de PlateMapper) antes de seleccionar el botón **Analyze** (Analizar), en el informe aparecerá un *Plate Name* (Nombre de placa) incorrecto. Cierre el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software antes de pasar de la pestaña *PlateMapper Setup* (Configuración de PlateMapper) a *CDx Analysis* (Análisis de CDx).

- 11.19.5. Una vez seleccionados los tres archivos, podrá seleccionar el botón **Analyze** (Analizar). Haga clic en **Analyze** (Analizar) y se generarán tres tipos de informes en la carpeta de destino: un *PDF Run Report* (Informe del desarrollo en PDF), un *PDF Sample Report(s)* (Informe de la muestra en PDF) y un *CSV run export file* (Archivo de exportación del desarrollo en CSV) (consulte la Figura 4, la Figura 5 y la Figura 6).

- El *Run Report* (Informe del desarrollo) contendrá un resumen de los resultados de los controles y las muestras.
- El *Sample Report* (Informe de la muestra) contendrá los resultados de los controles y de la muestra.
- El *CSV run export file* (Archivo de exportación del desarrollo en CSV) contendrá los resultados del desarrollo en una hoja de cálculo. Los identificadores de los informes del software LeukoStrat CDx *FLT3* Software se corresponden con los 12 últimos caracteres de los identificadores que genere el software.



LeukoStrat® CDx FLT3 Software

Run Report:

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

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

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

Report Comments
N/A

* Indicates additional notes on Sample Report

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

LeukoStrat® CDx FLT3 Software

Sample Report:

Sample and Run Information			
Sample Name	SampleA01_ITD_SAMPLE_A01		
Sample ID	21c1a415-6fad-4f69-af8e-535ad212c275		
Plate ID	9dd67e4f-d8d0-4016-b72c-f7179eaae829	Assay	ITD
Plate Barcode	01234	Analysis Date	2022-12-02 10:49:49 AM
Plate Name	UnitTestPlate		
Run ID	fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	Sample Pos/Neg/Fail	Positive

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

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

Sample Notes
N/A

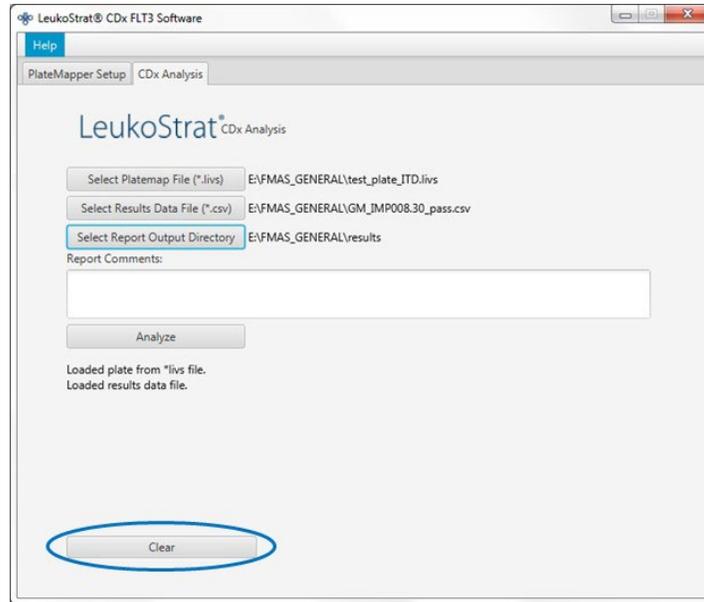
Report Comments
N/A

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

Run ID	Assay	Run Result	Sample ID	Sample Type	EC ID	Sample Name	Sample Result	Signal Ratio	Sample Notes	Software Version
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	f7abf689-888e-4942-8202-08277bd1d8e5	PC		PControl1_ITD_PC_H01	POS	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	323a17c2-c7bf-4d57-9c86-4a6bf004c2d2	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-a8fe-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	29533bfb-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	b19bc1d0-092c-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	7a3b221f1-c898-424a-bb66-72c79c6c5c13	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA11_ITD_SAMPLE_A11	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD

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

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



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

Tabla 9: Mensajes de error y acciones correctivas

Mensaje de error al cargar los datos de resultados	Posibles causas	Acciones correctivas
<ul style="list-style-type: none"> <i>Unrecognized dye: <dye letter></i> (Colorante desconocido: <letra del colorante>) [AD01] 	Se ha seleccionado un colorante que no se usa en el análisis con GeneMapper.	Asegúrese de que solo se seleccionen los colorantes rojo, verde y azul durante el análisis con GeneMapper.
<ul style="list-style-type: none"> <i>No red dye detected. Please make sure red dye is selected during previous signal analysis step</i> (No se ha detectado colorante rojo. Asegúrese de seleccionar el colorante rojo en el paso previo al propio análisis) [AD02] 	No se ha seleccionado colorante rojo durante el análisis con GeneMapper.	Asegúrese de seleccionar colorante rojo durante el análisis con GeneMapper.
<ul style="list-style-type: none"> <i>Unrecognized data results file format</i> (No se reconoce el formato del archivo de los resultados de datos) [AD03] 	El archivo de GeneMapper está dañado.	No modifique el archivo del software GeneMapper de ningún modo.
<ul style="list-style-type: none"> <i>Unable to load *.livs platemap file; incorrect format</i> (No se puede cargar el archivo .livs del mapa de la placa; formato incorrecto) [AD04] 	El archivo LIVS está dañado.	No modifique el archivo LIVS de ningún modo.
<ul style="list-style-type: none"> <i>Did not find run for runId <runId></i> (No se ha encontrado el desarrollo asociado al identificador <id. del desarrollo>) [AD05] <i>Did not find sample for sample name <sampleName></i> (No se ha encontrado la muestra asociada con el nombre <nombre de la muestra>) [AD06] 	Se ha seleccionado un archivo LIVS incorrecto o el archivo LIVS está dañado.	Asegúrese de seleccionar el archivo LIVS correcto asociado con el análisis.
<ul style="list-style-type: none"> <i>General error loading results data file; please contact technical support</i> (Error general al cargar el archivo de datos de resultados; póngase en contacto con el servicio técnico) [AD07] 	Se ha producido un error desconocido.	Póngase en contacto con el servicio técnico.
<ul style="list-style-type: none"> <i>String index out of range: -1</i> (Índice de secuencia incorrecto: -1) 	No se seleccionó <Nombre de la muestra> en primer lugar al configurar la convención del nombre del archivo (consulte el apartado 11.16.14).	Repita el desarrollo a partir del paso 11.12, <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> , e introduzca un nombre de archivo correcto.
<ul style="list-style-type: none"> <i>String index out of range: 15</i> (Índice de secuencia incorrecto: 15) 	Se ha modificado el archivo de resultados CSV.	Repita la exportación del archivo de resultados CSV desde GeneMapper. No modifique el archivo CSV de ningún modo.

12. Control de calidad

12.1. Validez del desarrollo

12.1.1. El software LeukoStrat CDx *FLT3* Software evalúa automáticamente los resultados.

12.1.2. Si el resultado del desarrollo es *Fail* (Error), no son válidos los resultados de las pruebas de desarrollo. La prueba deberá reiniciarse desde un punto u otro en función del *Fail Detail* (Código de error) (consulte el apartado 14, *Repetición de la prueba*).

12.2. Control de extracción y validez de las muestras

12.2.1. Es posible que haya muestras no válidas (*Fail* [Error]) en un desarrollo válido. Si alguno de los controles de extracción no reúne los criterios de validez, las muestras asociadas con dicho control de extracción se considerarán *Fail* (Errores).

12.2.2. Es posible que también fallen muestras con controles válidos si no se reúnen las condiciones necesarias. La prueba deberá reiniciarse desde un punto u otro en función del código de error que genere el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software (consulte el apartado 14, *Repetición de la prueba*).

NOTA: Si se observan varios errores con el mismo tipo de código de error, la estrategia de repetición de la prueba es distinta de la estrategia por errores aislados del control o de la muestra (consulte el apartado 14: *Repetición de la prueba*).

13. Interpretación de los resultados

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

Tabla 10: Determinación del estado de mutación de la muestra

Supuesto	Resultado del software para DIT	Relación de la señal para DIT	Resultado del software para DTC	Relación de la señal para DTC	Resultado final de la prueba
1	Positivo	$\geq 0,05$	Positivo	$\geq 0,05$	Positivo
2	Negativo	$< 0,05$	Negativo	$< 0,05$	Negativo
3	No válido	N. P.	No válido	N. P.	No válido
4	Positivo	$\geq 0,05$	Negativo	$< 0,05$	Positivo
5	Negativo	$< 0,05$	Positivo	$\geq 0,05$	Positivo
6	Positivo	$\geq 0,05$	No válido	N. P.	Positivo
7	Negativo	$< 0,05$	No válido	N. P.	No válido
8	No válido	N. P.	Positivo	$\geq 0,05$	Positivo
9	No válido	N. P.	Negativo	$< 0,05$	No válido

- 13.6. Para determinar si está indicado clorhidrato de quizartinib:
- 13.6.1. Si la relación de la señal mutada-sin mutar de una muestra de tipo DIT válida es igual o superior al valor de corte clínico (0,05), el resultado será **positivo para DIT** y se indicará el clorhidrato de quizartinib.
- 13.6.2. Si la relación de la señal mutada-sin mutar de una muestra de tipo DIT válida es menor al valor de corte clínico (0,05), el resultado será **negativo para DIT** y no se indicará el clorhidrato de quizartinib.
- 13.6.3. Si el resultado para DIT no es válido, el resultado será **no válido para DIT** y no se indicará el clorhidrato de quizartinib.
- 13.7. En el informe que genera el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software aparecen los códigos de error; repita el desarrollo o el análisis de las muestras de acuerdo con las instrucciones que figuran en el apartado 14, *Repetición de la prueba*.

14. Repetición de la prueba

14.1. Desarrollos no válidos

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

14.2. Control de extracción no válido en desarrollos válidos

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

14.3. Muestras no válidas en desarrollos válidos

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

14.4. Códigos de error y repetición de la prueba

- 14.4.1. La Tabla 11 y la Tabla 12 recogen los datos de repetición de las pruebas de acuerdo con los códigos de error por tipo de muestra para DIT y DTC, respectivamente. Consulte la Tabla 13 para conocer los códigos de repetición que aparecen en la Tabla 11 y la Tabla 12.
- 14.4.2. El algoritmo de repetición es el siguiente:
 - 1) Control positivo (CP) o control sin molde (CSM) para DIT o DTC no válidos (consulte el apartado 14.1)
 - 2) Control de extracción (CE) no válido en un desarrollo válido (consulte el apartado 14.2)
 - 3) Muestras no válidas en un desarrollo válido (consulte el apartado 14.3)

La Figura 7 recoge un árbol lógico de repetición de la prueba.

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

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

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

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

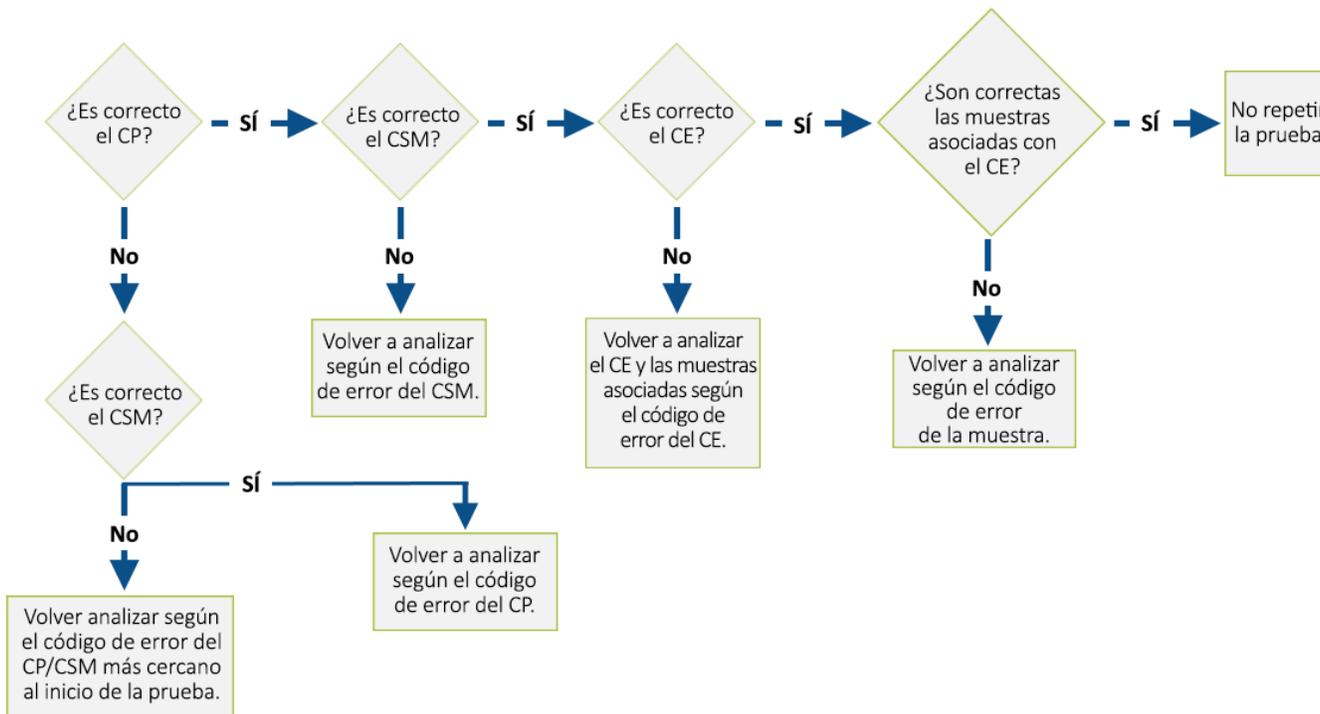


Figura 7. Árbol lógico de repetición de la prueba

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

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

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

Código de error para DIT	Controles			Muestras	
	CP	CSM	EC	Muestra pos.	Muestra neg.
IR80: Error de la muestra					Cuant/Proc
IR91: Error de la muestra o del control	EC	EC	EC	EC	EC

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

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

Tabla 13: Códigos de repetición

Código de repetición	Descripción	Punto de inicio de la repetición
Amp	Repita desde la fase de amplificación y utilice diluciones previas de muestras de ADN.	11.10. <i>Amplificación</i>
EC	Repita desde la fase de electroforesis capilar. Prepare una nueva placa para EC con un amplicón nuevo (procedente de la placa para PCR para DIT o DTC) y asegúrese de incluir también el control positivo, el control sin molde y los controles de extracción asociados.	11.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i>
EC/Amp EC/Q-Amp	Repita la prueba siguiendo las instrucciones indicadas para el código de repetición EC. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, repita la prueba una vez más siguiendo las instrucciones indicadas en Amp. o Q-Amp.	11.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> 11.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> 11.10. <i>Amplificación</i>
EC/Proc	Repita la prueba siguiendo las instrucciones indicadas para el código de repetición EC. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, vuelva a procesar la muestra desde la fase relativa a la sangre periférica o al aspirado de médula ósea.	11.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> 11.2. <i>Preparación para el procesamiento de la muestra</i>
EC-DS	Repita desde la fase de electroforesis capilar. Prepare una nueva placa para EC con un amplicón nuevo (procedente de la placa para PCR para DIT o DTC) y asegúrese de incluir también el control positivo, el control sin molde y los controles de extracción asociados (consulte el apartado 14.6, <i>Cambio de colorante</i>). Si se obtiene un mismo código de error (IR07) por segunda vez, registre la muestra como no válida.	11.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i>
Ctrl	Repita la prueba siguiendo las instrucciones relativas al control que generó el error.	Varía
Dig	Repita desde la fase de digestión; utilice un amplicón nuevo (procedente de la placa para PCR para DTC), los controles de extracción asociados y los controles necesarios.	11.11. <i>Digestión con la enzima de restricción (solo para mutados en el DTC)</i>
Dig/Proc	Repita la prueba siguiendo las instrucciones relativas al código de repetición Dig. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, vuelva a procesar la muestra desde la fase relativa a la sangre periférica o al aspirado de médula ósea.	11.11. <i>Digestión con la enzima de restricción (solo para mutados en el DTC)</i> 11.2. <i>Preparación para el procesamiento de la muestra</i>
Q-Amp	Repita desde la fase de cuantificación de los controles de extracción y utilice diluciones previas de la muestra de ADN.	11.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> 11.10. <i>Amplificación (muestras)</i>
Cuant	Repita desde la fase de cuantificación de las muestras y los controles de extracción asociados.	11.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> 11.10. <i>Amplificación (muestras)</i>
Cuant/Proc	Repita la prueba siguiendo las instrucciones relativas al código de repetición Cuant. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, vuelva a procesar la muestra desde la fase relativa a la sangre periférica o al aspirado de médula ósea.	11.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN</i> 11.2. <i>Preparación para el procesamiento de la muestra</i>
Xtalk/Amp Xtalk/Q-Amp Xtalk/Cuant/Proc	Coloque una nueva placa para EC, de modo que las muestras estén separadas mediante 5 capilares vacíos (es decir, cargue las muestras en los pocillos A01, C01, E01 y G01 en la inyección 1; cargue las muestras en dichos pocillos en el resto de las inyecciones). Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, repita la prueba una vez más siguiendo las instrucciones indicadas en Amp, Q-Amp o Cuant. Si la repetición de acuerdo con Cuant da lugar al mismo código de error, vuelva a procesar la muestra desde la fase relativa a la sangre periférica o al aspirado de médula ósea.	11.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> 11.9. <i>Cuantificación y dilución del ADN (controles de extracción)</i> 11.10. <i>Amplificación (muestras, CP)</i> 11.2. <i>Preparación para el procesamiento de la muestra</i>

14.5. Varios errores en un mismo desarrollo

- 14.5.1. Suelen observarse errores aislados en muestras y controles, pero también pueden observarse códigos de error en varios o todos los pocillos. Cuando se produzca este tipo de error, repita el desarrollo con todas las muestras, el control positivo, los controles de la extracción asociados y el control sin molde de acuerdo con la tabla 14; los códigos de repetición se recogen en la Tabla 15.
- 14.5.2. Las acciones correctivas adicionales pueden abarcar las siguientes instrucciones:
 - 14.5.2.1. Abra el archivo CSV para confirmar que contiene los resultados de todas las muestras y controles a los que se haya asociado un archivo FSA en el 3500xL o 3500xL Dx.
 - 14.5.2.2. Asegúrese de que, en el archivo CSV, estén las columnas necesarias, los límites máximos sean los adecuados (es decir, no debe haber picos inferiores a 100 en azul o verde ni inferiores a 50 en rojo) y las columnas contengan números distintos de cero.

Tabla 14: Repetición, varios errores en un mismo desarrollo

Tipo de muestra	Código de error	Código de repetición
CP, DIT	IR31	Amp
CSM, DIT	IR40	
CE, DIT	IR51	
CP, DTC	TR30	
CSM, DTC	TR40	
CE, DTC	TR50	
CP, DIT	IR33	EC/Amp
Muestra, DIT	IR70	
CP, DTC	TR32	
Muestra, DTC	TR71	
CP, DIT	IR32	
CE, DIT	IR52	
Muestra, DIT	IR80	
CP, DTC	TR31	
CE, DTC	TR51	
Muestra, DTC	TR81	
Todos DIT en una inyección	IR91	EC-SP
Todos DTC en una inyección	TR93	
Todos DIT en un desarrollo	IR04	GM
Todos DTC en un desarrollo	TR04	

Tabla 15: Códigos de repetición, repetición por errores múltiples

Código de repetición	Descripción	Punto de inicio de la repetición
Amp	Repita desde la fase de amplificación y utilice diluciones previas de ADN de la muestra. Asegúrese de introducir los tubos en el agitador vortical y de añadir la Taq.	11.10. <i>Amplificación</i>
EC	Repita desde la fase de electroforesis capilar. Prepare una nueva placa para EC con un amplicón nuevo (procedente de la placa para PCR para DIT o DTC) y una solución patrón nueva. Asegúrese de que el control positivo, el control sin molde y los controles de extracción asociados también estén presentes en la placa que contiene la muestra fallida.	11.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i>
GM	Vuelva a crear los archivos de datos de exportación con el software GeneMapper y asegúrese de fijar los límites en 100 URF para azul y verde.	11.18 <i>Análisis de datos con el software GeneMapper</i>
EC/Amp	Repita la prueba siguiendo las instrucciones indicadas para el código de repetición EC. Si la repetición de la prueba da lugar al mismo código de error, repita la prueba una vez más siguiendo las instrucciones indicadas en Amp.	11.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i> 11.10. <i>Amplificación</i>
EC-SP	Repita desde la fase de electroforesis capilar y utilice una solución patrón nueva.	11.12. <i>Detección mediante electroforesis capilar</i>

14.6. Cambio de colorante

En casos poco frecuentes, en los que se ven insertos de gran tamaño en el DTC, el software LeukoStrat CDx *FLT3* Software puede identificar de forma errónea picos mutados. Para confirmar el cambio de colorante, repita la electroforesis capilar con una placa de electroforesis capilar y un amplión nuevos a partir de la placa para PCR para DIT guardada.

15. Limitaciones del procedimiento

- 15.1. Analice solo los tipos de muestras indicados; LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se ha validado para usarse exclusivamente con sangre periférica y aspirado de médula ósea. La fiabilidad de los resultados depende de la conservación y el procesamiento de las muestras. Por lo tanto, siga los procedimientos que figuran en este documento.
- 15.2. Para validar LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, se ha utilizado el minikit de ADN en sangre QIAamp® DSP para extracción de ADN genómico.
- 15.3. LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay detecta mutaciones por DIT de entre 3 pb y 323 pb. Sin embargo, la prueba se ha validado para detectar únicamente mutaciones de entre 30 pb y 279 pb.
 - Los insertos en DIT de entre 3 pb y 30 pb aparecen como mutaciones por DIT.
 - Los insertos en DIT de entre 279 pb y 323 pb aparecen como mutaciones por DIT.
 - La prueba no detecta insertos en DIT con un tamaño superior a 323 pb.
- 15.4. La prueba no detecta aquellas mutaciones de *FLT3* que no se ajusten al nivel de sensibilidad de la prueba.
 - 15.4.1. Para los insertos en DIT de entre 30 pb y 126 pb, una relación alélica de 0,08 dará lugar a un resultado positivo en LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
 - 15.4.2. Para los insertos en DIT de entre 129 pb y 279 pb, una relación alélica de 1 dará lugar a un resultado positivo en LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
 - 15.4.3. Para las mutaciones en DTC que modifiquen el lugar de la EcoRV, una relación alélica de 0,18 dará lugar a un resultado positivo en LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 15.5. El dispositivo presenta distintas tasas de variabilidad de la relación de la señal según el tipo de mutación de *FLT3*, que se presentan a continuación:
 - 15.5.1. Para insertos en DIT de entre 21 pb y 90 pb, la variabilidad de la relación de la señal oscila entre un 4,4 % y un 8,5 %.
 - 15.5.2. Para insertos en DIT de 217 pb, la variabilidad de la relación de la señal oscila entre un 26,9 % y un 27,2 %.
 - 15.5.3. Para las mutaciones de DTC que modifican el lugar de la EcoRV, la variabilidad de la relación de la señal oscila entre un 4,2 % y un 5,9 %.
- 15.6. Los resultados de la prueba siempre se deben interpretar en el contexto de los datos clínicos y de otras pruebas realizadas a los pacientes.
- 15.7. Se determinó que el rendimiento clínico de la prueba utilizando datos del estudio de precisión clínica es:
 - 15.7.1. Sensibilidad diagnóstica: 1
 - 15.7.2. Especificidad diagnóstica: 0,92
 - 15.7.3. Razón de verosimilitud positiva: 12,5
 - 15.7.4. Razón de verosimilitud negativa: 0
- 15.8. La detección de una mutación depende del número de copias de la secuencia mutada y puede verse afectada por la integridad de la muestra, la cantidad de ADN aislado y la presencia de sustancias interferentes. Las pruebas de tipo PCR están sujetas a interferencia por degradación del ADN o inhibición de la PCR por EDTA y otros compuestos.
- 15.9. El uso del producto debe limitarse a técnicos que conozcan las técnicas de PCR y LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 15.10. LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay es una prueba cualitativa. La prueba no se ha diseñado para realizar mediciones cuantitativas de mutaciones por DIT o en DTC.
- 15.11. No puede calcularse, medirse ni determinarse la relación alélica de la muestra utilizando esta prueba.

16. Valores previstos

16.1. Tamaños previstos de los productos amplificados

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

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

Tabla 16: Tamaño previsto del amplicón

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

^a**Nota:** Un pequeño pico de producto de 127 pb puede o no estar presente en el control de extracción.

17. Evaluación del rendimiento no clínico

17.1. Sensibilidad analítica: límite del blanco (LB)

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

17.2. Sensibilidad analítica

17.2.1. El LD (límite de detección) de la prueba se evaluó en dos estudios. En el primer estudio, se usaron muestras artificiales creadas mezclando estirpes celulares con sangre completa pobre en leucocitos. Se usaron muestras de estirpes celulares para representar los cuatro tamaños de insertos de DIT: insertos de 21 pb, insertos de 30 pb, insertos de 126 pb e insertos de 279 pb. También se evaluó una estirpe celular adicional que contenía la mutación D835. El ADN se diluyó en 5 ng/μL, 10 ng/μL y 15 ng/μL; se analizaron varias relaciones alélicas por cada estirpe celular. Se realizó un segundo estudio con muestras clínicas para confirmar las observaciones para el LD relativas a las estirpes celulares. Se diluyeron cinco muestras clínicas y varias muestras clínicas negativas para generar una relación de señal objetivo (RSO) que se ajustara al intervalo lineal del patrón de la estirpe celular en cuestión (Tabla 17). Cada muestra se diluyó en 5 niveles para representar un bajo negativo (BN), alto negativo (AN), cerca del valor de corte (VC), bajo positivo (BP) y moderado positivo (MP). Estas muestras, en intervalo lineal, se analizaron mediante LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, que determinó el valor medio de la RS. Un operario acostumbrado a usar el equipo analizó 20 veces cada dilución de las muestras clínicas del LD por nivel de dilución durante cuatro días no consecutivos (5 réplicas al día). Se calculó la RA de las diluciones de las muestras clínicas del LD utilizando la RA calculada en las curvas patrón de las estirpes celulares. Se calculó la RA de las muestras clínicas del LD considerando que el estudio reuniría los siguientes criterios de aceptación:

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

Tabla 17: RS, RA y LD por muestra y nivel de dilución

Id. de la muestra	Mutación	Nivel	RSO	RS media	RA de la mezcla	N válida	N (%) RS > LB	N (%) RS ≥ 0,05	*Clasificación
DTC CS1	DTC I836	BN	0,02	0,02	0,039	20	20 (100,0)	0	LD del análisis
		AN	0,03	0,03	0,057	20	20 (100,0)	0	-
		VC	0,05	0,05	0,094	20	20 (100,0)	16 (80,0 %)	Valor de corte
		BP	0,08	0,07	0,144	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Por encima del valor de corte
		MP	0,13	0,12	0,224	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
DTC CS2	DTC D835	BN	0,01	0,02	0,023	20	20 (100,0)	0	LD del análisis
		AN	0,02	0,03	0,047	20	20 (100,0)	0	-
		VC	0,04	0,05	0,089	20	20 (100,0)	19 (95,0)	Valor de corte Por encima del valor de corte
		BP	0,07	0,08	0,152	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
		MP	0,13	0,15	0,269	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
DIT CS1	DIT 24 pb	BN	0,02	0,02	0,044	20	20 (100,0)	0	LD del análisis
		AN	0,03	0,03	0,065	20	20 (100,0)	0	-
		VC	0,05	0,05	0,107	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Valor de corte Por encima del valor de corte
		BP	0,08	0,08	0,165	20	19 (95,0)	19 (95,0)	-
		MP	0,13	0,13	0,257	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
ITS-CS2	DIT 66 pb	BN	0,02	0,02	0,045	20	20 (100,0)	0	LD del análisis
		AN	0,03	0,03	0,066	20	20 (100,0)	0	-
		VC	0,05	0,05	0,110	20	20 (100,0)	18 (90,0)	Valor de corte
		BP	0,09	0,08	0,189	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Por encima del valor de corte
		MP	0,14	0,13	0,280	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
DIT CS3	DIT 217 pb	BN	0,01	0	0,073	20	2 (10,0)	0	-
		AN	0,02	0,02	0,147	20	15 (75,0)	0	-
		VC	0,04	0,04	0,276	20	20 (100,0)	9 (45,0)	LD del análisis Valor de corte
		BP	0,08	0,08	0,539	20	19 (95,0)	19 (95,0)	Por encima del valor de corte
		MP	0,13	0,13	0,838	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
DIT neg. real	Ninguna	TN	N. P.	0	0	20	0	0	N. P.
DTC neg. real	Ninguna	TN	N. P.	0	0	20	0	0	N. P.

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

17.2.2. LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay es capaz de detectar las siguientes relaciones alélicas mutadas-no mutadas por encima del valor de corte clínico de los siguientes tipos de mutación:

- 17.2.2.1. Para los insertos en DIT de 24 pb, se detectó una relación alélica de 0,107 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 7,1 %.
- 17.2.2.2. Para los insertos en DIT de 66 pb, se detectó una relación alélica de 0,189 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 7,1 %.
- 17.2.2.3. Para los insertos en DIT de 217 pb, se detectó una relación alélica de 0,539 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 25,6 %.
- 17.2.2.4. Para las mutaciones D835 en DTC que destruyen el sitio de la EcoRV, se detectó una relación alélica de 0,089 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 4,5 %.
- 17.2.2.5. Para las mutaciones I836 en DTC que destruyen el sitio de la EcoRV, se detectó una relación alélica de 0,144 por encima del valor de corte de la RS en más del 95 % de las muestras. El %CV de la RS de estas muestras fue del 5,7 %.
- 17.2.2.6. La conversión de los valores de la RA a % de mutación se recoge en la siguiente tabla.

Tabla 18: Sensibilidad analítica, relación alélica y % de mutación

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

17.3. Precisión

- 17.3.1. La precisión de LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay se determinó mediante el análisis independiente, por parte de tres operarios, de 10 réplicas de muestras con mutación por DIT con insertos de entre 21 pb y 126 pb y muestras con mutación en DTC. Las 10 réplicas se analizaron en lotes de dos en un total de cinco ocasiones.
- 17.3.2. Para las muestras de mutación por DIT, los intervalos del %CV de la RS para los tres operarios fueron del 7,4-15,0 %, del 3,7-13,0 % y del 4,2-8,8 %.
- 17.3.3. Para las muestras de mutación en DTC, los intervalos del %CV de la RS para los tres operarios fueron del 6,3-11,2 %, del 5,8-9,3 % y del 5,5-8,3 %.

17.4. Reproducibilidad entre operarios (estirpes celulares)

- 17.4.1. Las muestras procedían de estirpes celulares con mutaciones por DIT con insertos de 21 pb, 30 pb y 126 pb y mutaciones D835 en DTC. Las muestras representaron una RS mutada-sin mutar baja (cerca al valor de corte), media y alta (estirpe celular mutada al 100 %) para insertos pequeños de duplicación interna en tándem (DIT), insertos grandes de DIT y mutaciones en el dominio tirosina cinasa (DTC). Los tres operarios usaron un mismo lote de reactivos y un mismo instrumento en 15 desarrollos de 10 réplicas. El %CV de la RS osciló entre el 6,6 % y el 13,3 %.
- 17.4.2. Para las muestras de la mutación en DTC, el %CV de la RS varió entre el 7,9 % y el 9,3 %.
- 17.4.3. Para las muestras de la mutación por DIT con insertos de hasta 30 pb, el %CV de la RS varió entre el 6,6 % y el 9,4 %.
- 17.4.4. Para las muestras de la mutación por DIT con insertos de 126 pb, el %CV de la RS varió entre el 9,0 % y el 13,3 %.

17.5. Reproducibilidad entre operarios (muestras clínicas)

- 17.5.1. En un segundo estudio, se evaluó la precisión con muestras clínicas de ADN de 7 muestras clínicas (5 de sangre periférica y 2 de médula ósea) con longitudes de 21 pb, 24 pb, 66 pb, 90 pb y 217 pb para DIT, sustitución de D835 para DTC, deleción de I836 para DTC, y 8 muestras negativas para la mutación en *FLT3* (4 de sangre periférica y 4 de médula ósea). El ADN de las muestras clínicas negativas para mutaciones en *FLT3* se combinó y se usó para diluir las muestras positivas para *FLT3* con el fin de alcanzar tres niveles objetivo de RS cercana al valor de corte clínico de la prueba (es decir, alto negativo [AN], bajo positivo [BP] y moderado positivo [MP]). Esto dio lugar a cinco muestras clínicas positivas para la mutación en *FLT3* de sangre periférica y a dos de médula ósea. Tres operarios/equipos analizaron tres réplicas de 5 muestras positivas para DIT, 2 muestras positivas para DTC y una muestra reagrupada negativa usando 1 lote de reactivos durante cinco días no consecutivos, en tres niveles de dilución para las muestras positivas y sin dilución para la muestra negativa. Cada operario analizó un total de 15 réplicas por nivel y de 45 réplicas por nivel de dilución.
- 17.5.2. La Tabla 19 recoge el %CV para todos los tipos de mutación y niveles de dilución. El %CV para todos los tipos de mutación, excepto para la muestra de DIT con un inserto de gran tamaño (217 pb), fue de entre el 4,2 % y el 16,1 %. La muestra con un %CV de mutación de 217 pb fue de entre el 26,9 % y el 27,2 %. El %CV del nivel de dilución bajo

positivo (BP) fue del 26,9 % (217 pb), por lo que no se ajustó al criterio de aceptación del estudio: ≤ 25 % de CV para la RS. Los resultados indican que se cumplieron los criterios de aceptación para las mutaciones D835 e I836 en DTC y las mutaciones por DIT de hasta 217 pb. La variación para la mutación por DIT de 217 pb superó el 25 %, lo que indica una mayor imprecisión en torno a las mutaciones por DIT de mayor tamaño.

Tabla 19: Componentes de la varianza por tipo de mutación y nivel de dilución

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

17.6. Reproducibilidad entre lotes y entre instrumentos

- 17.6.1. La reproducibilidad entre lotes y entre instrumentos la determinó un solo operario, que analizó un conjunto de muestras con tres lotes de reactivos y tres conjuntos de instrumentos. Las muestras de estirpes celulares contenían mutaciones por DIT, con insertos de entre 21 pb y 126 pb, y mutaciones en DTC.
- 17.6.2. Para las muestras de mutación por DIT, el %CV de la RS varió entre el 3,0 % y el 8,4 %.
- 17.6.3. Para muestras de mutación en DTC, el %CV de la RS varió entre el 5,4 % y el 10,6 %.

17.7. Sustancias interferentes: exógenas

- 17.7.1. LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay detecta mutaciones por DIT de entre 18 pb y 114 pb y mutaciones en DTC en presencia de heparina sódica y la solución amortiguadora de lavado utilizada durante el proceso de aislamiento del ADN.

17.8. Sustancias interferentes: endógenas

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

17.9. Sustancias interferentes: fármacos

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

17.10. Transferencia y contaminación cruzada

- 17.10.1. Cuando se pusieron a prueba mediante la configuración de mapas de placas habituales, se demostró que la transferencia y la contaminación cruzada no representan un problema para LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay:
- 17.10.1.1. La tasa de transferencia/contaminación cruzada fue del 0 %.
 - 17.10.1.2. La tasa de error del control sin molde en DIT y DTC fue del 0 %.

17.11. Aportaciones de ADN

- 17.11.1. El objetivo del estudio fue presentar datos que demostraran la equivalencia con aportaciones de ADN de 10 ± 3 ng/ μ L. Se usaron réplicas de ADN extraídas del estudio del límite de detección y del intervalo dinámico con muestras artificiales; se analizaron solo los integrantes del panel que presentaban una relación alélica más baja. Las muestras de ADN, que figuran a continuación, se diluyeron en 7, 10 y 13 ng/ μ L y se analizaron usando la prueba y una sola réplica del control negativo.
- 30 pb (DIT) con una RA de 0,03 (33 réplicas por nivel de aportación de ADN)
 - D835 (DTC) con una RA de 0,05 (33 réplicas)
 - 126 pb (DIT) con una RA de 0,05 (22 réplicas)
 - 279 pb (DIT) con una RA de 1 (11 réplicas)
- 17.11.2. Se reunieron los criterios de aceptación para las muestras de estirpes celulares de 30 pb (DIT), 126 pb (DIT) y D835 (DTC). 1. >93,9 % de las réplicas reunieron los criterios de validez para cada tipo de muestra y aportación de ADN. 2. El coeficiente de variación (CV) global fue <20,5 % para todos los tipos de muestras. 3. El CV fue <21,0 % para todos los tipos de muestras cuando las réplicas se combinaron por aportación de ADN en 7-10 ng/ μ L y en 13-10 ng/ μ L. No se reunieron los criterios de aceptación relativos a la estirpe celular con DIT de gran tamaño. Aunque el 100 % de las réplicas reunió los criterios de validez de las muestras, el CV global y el CV entre aportaciones de ADN combinadas superaron el 25 %.
- 17.11.3. La diferencia por lo que respecta a la media de la RS mutada-sin mutar para las aportaciones de ADN no fue superior a 0,022; las diferencias entre medias no fueron especialmente distintas. La prueba arroja resultados coherentes cuando se utilizan aportaciones de ADN de 10 ± 3 ng/ μ L.

17.12. Validación de tubos de extracción de sangre con EDTA

- 17.12.1. El propósito de este estudio fue validar los tubos de extracción de sangre con EDTA. En este estudio, se utilizaron muestras artificiales de estirpes celulares con DIT que contenían insertos de 21 pb, 126 pb y 279 pb, así como de estirpes celulares con una mutación D835 (DTC) agregadas a sangre periférica extraída en heparina sódica o EDTA. Las muestras presentaron RS mutada-sin mutar negativas altas, positivas bajas (cercasas al valor de corte) y positivas moderadas. Se utilizó sangre periférica sola para las muestras negativas reales.
- 17.12.2. Las muestras de nivel positivo bajo y positivo moderado dieron lugar a un 100 % de réplicas positivas de muestras tanto en EDTA como en heparina sódica. Las muestras de nivel negativo alto y negativas reales dieron lugar a un 100 % de réplicas negativas de muestras tanto en EDTA como en heparina sódica. Por lo tanto, se cumplieron los criterios de aceptación.
- 17.12.3. Se cumplieron todos los criterios de aceptación de validación y se validó el uso de los tubos de extracción de sangre con EDTA en LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

17.13. Validación de medios en gradiente de densidad

- 17.13.1. El objetivo de este estudio fue validar el uso de cualquier medio en gradiente de densidad (con una densidad de 1,077 g/mL) en LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Se mezclaron estirpes celulares (insertos de 21 pb y 279 pb, y D835 [DTC]) con sangre periférica sana en tres fracciones de células mutadas bajas por estirpe celular (lo que dio lugar a nueve integrantes del panel). La sangre periférica sana también se analizó como muestra negativa para *FLT3* (lo que dio lugar a un integrante del panel). Dos operarios aislaron células mononucleares a partir de dos réplicas de muestras con medios para gradiente de densidad (MGD) de tres fabricantes en dos días, lo que dio lugar a ocho réplicas de muestras aisladas por integrante del panel y medio para gradiente de densidad.
- 17.13.2. El porcentaje de reconocimiento global de muestras positivas de dos fabricantes de MGD adicionales (MGD2 y MGD3) se comparó con el MGD que se validó inicialmente para su uso con LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay (MGD1). El MGD1 presentó un 37,5 % de reconocimiento de muestras positivas entre los 10 integrantes del panel. El MGD2 presentó un 35 % de reconocimiento de muestras positivas y el MGD3, un 36,3 %. Por lo tanto, se cumple

el requisito de reconocimiento de muestras positivas en un intervalo del 10 % con respecto al MGD1 (2,5 % y 1,2 %, respectivamente).

- 17.13.3. Se cumplieron todos los criterios de aceptación del estudio, lo que valida el uso de cualquier medio para gradiente de densidad de 1,077 g/mL en LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

17.14. Validación del NEBuffer 3.1

- 17.14.1. Este estudio se diseñó para proporcionar pruebas objetivas de que, en LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, se puede utilizar NEBuffer 3.1 en lugar de NEBuffer 3 y BSA. Se analizaron cinco muestras de ADN positivas para el reemplazo de D835 (DTC), cinco positivas para la delección de I836 (DTC), una en el límite para D835 (DTC), y ocho negativas para la mutación en DTC con un lote de NEBuffer 3 y BSA y tres lotes de NEBuffer 3.1. Se analizaron tres réplicas de muestras por NEBuffer, lo que representa un total de 12 réplicas por muestra.
- 17.14.2. Todas las muestras que resultaron positivas con NEBuffer 3 y BSA también resultaron positivas con NEBuffer 3.1. Todas las muestras que resultaron negativas con NEBuffer 3 y BSA, también resultaron negativas con NEBuffer 3.1, lo que representa una concordancia del 100 % entre los tipos de NEBuffer. La diferencia porcentual de la relación de la señal entre los tipos de NEBuffer osciló entre un -4 % y un 5 % para las muestras positivas y en el límite. El %CV de la relación de la señal fue de entre 0 y 12,4 % para NEBuffer 3 y de entre 0 y 10,7 % para NEBuffer 3.1.
- 17.14.3. Se cumplieron todos los criterios de aceptación del estudio, lo que valida el uso de NEBuffer 3.1 en LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

17.15. Equivalencia: NEBuffer r3.1 frente a NEBuffer 3.1

- 17.15.1. El objetivo del estudio era proporcionar pruebas objetivas de que NEBuffer r3.1 es equivalente a NEBuffer 3.1 por lo que respecta a LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. NEBuffer (3.1 o r3.1) se utiliza con la enzima EcoRV, una endonucleasa de restricción, para digerir amplicones de DTC y detectar dos mutaciones de DTC (D835 e I836) mediante LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. La única diferencia entre NEBuffer 3.1 y NEBuffer r3.1 es que la albúmina de suero bovino del NEBuffer 3.1 se reemplaza por albúmina recombinante en el NEBuffer r3.1. El estudio se diseñó para analizar 8 muestras clínicas de ADN positivas para DTC (al menos una de las muestras presentaba la mutación I836) y 8 muestras clínicas de ADN negativas para DTC por triplicado usando 3 lotes de NEBuffer r3.1 para comparar con 1 lote de NEBuffer 3.1.
- 17.15.2. Hubo una concordancia del 100 % entre NEBuffer r3.1 y 3.1 para todas las muestras. Todas las muestras positivas para DTC se reconocieron como positivas y todas las muestras negativas para DTC se reconocieron como negativas.
- 17.15.3. NEBuffer r3.1 se validó para su uso con LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay, pues se cumplieron todos los criterios de aceptación.

17.16. Precisión y reproducibilidad en distintos centros

- 17.16.1. El objetivo del estudio fue determinar si LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay presentaba el rendimiento previsto en los análisis en tres centros independientes. Las muestras artificiales se crearon utilizando ADN de estirpe celular, así como un inserto de 126 pb y un inserto de 279 pb, ADN clínico de DIT con un inserto de 6 pb, un inserto de 69 pb y un inserto de 193 pb, ADN clínico de DTC con reemplazo de D835 (DTC) y delección de I836 (DTC), y ADN clínico negativo para *FLT3*. Todas las muestras clínicas positivas para mutación se analizaron en tres niveles de relación de la señal: negativo alto, positivo bajo y positivo moderado (lo que dio lugar a 15 integrantes del panel). Se fabricaron dos integrantes a partir de muestras de ADN clínico negativo y de ADN de estirpe celular. Estos se analizaron en dos niveles de relación de la señal: negativo alto y positivo bajo (lo que dio lugar a 4 integrantes del panel). Cada centro evaluó un total de 21 integrantes del panel.
- 17.16.2. Dos operarios de cada centro analizaron, en dos días no consecutivos, tres réplicas de muestras por integrante alternando entre dos de tres lotes de kits por centro. Cada centro analizó un total de 24 réplicas de muestras por integrante para un total de 72 réplicas de muestras por integrante para este estudio.
- 17.16.3. El %CV de la relación de la señal para los integrantes positivos del panel (con la excepción de los integrantes con insertos de DTI de gran tamaño) osciló entre el 3,8 % y el 13,4 % para los tres centros en conjunto (Tabla 20) y entre el 3,3 % y el 19,8 % para cada centro de forma individual (menos del 25 % del CV necesario).

Tabla 20: Componentes de la varianza para los integrantes del panel (IP) con niveles bajo y moderado

Tipo de IP	Nivel de RS	N	Media global	Centro/equipo		Operario		Día/desarrollo		Lote del kit		Error aleatorio		Variabilidad total	
				DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV
Pequeño 6 pb DIT	BP	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

Tabla 20: Componentes de la varianza para los integrantes del panel (IP) con niveles bajo y moderado

Tipo de IP	Nivel de RS	N	Media global	Centro/equipo		Operario		Día/desarrollo		Lote del kit		Error aleatorio		Variabilidad total	
				DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV
Medio 69 pb DIT	BP	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	6,0
Medio 126 pb DIT	BP	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
Grande 192 pb DIT	BP	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
Grande 279 pb DIT	BP	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
D835 DTC	BP	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
	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
I836 DTC	BP	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

*Se eliminaron los valores atípicos: dos mutaciones por DIT moderadas positivas medias de 69 pb y una en DTC (D835) positiva moderada

- 17.16.4. El límite inferior de los intervalos de confianza bilaterales del 95 % de Clopper-Pearson para las concordancias porcentuales positivas y negativas (con la excepción de los integrantes con insertos [DIT] grandes) para los tres centros en conjunto fue $\geq 95,0\%$ y del $90,3\%$, respectivamente, por lo que se superó el criterio del 90% necesario.
- 17.16.5. Se cumplieron todos los criterios de aceptación del estudio, lo que valida una versión distribuible de LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay para su uso en centros adicionales.

17.17. Equivalencia de muestras de sangre periférica y médula ósea

- 17.17.1. LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay está diseñado para detectar mutaciones en el ADN genómico (ADNg), aislado de sangre periférica (SP) o aspirados de médula ósea (MO). El objetivo del estudio era ofrecer pruebas objetivas de que el ADNg aislado de muestras emparejadas de MO y SP arroja resultados concordantes para ambos tipos de muestras.
- 17.17.2. Se recogieron previamente muestras emparejadas de MO y SP (del mismo paciente y día) de los centros de recogida clínica para respaldar los estudios de validación analítica. También se recogieron muestras emparejadas en el marco del estudio Astellas 2215-CL-0301. El conjunto de muestras estaba compuesto por 95 pares: 62 pares procedentes de centros clínicos de recogida y 33 pares procedentes del estudio Astellas 2215-CL-0301. Para calcular la concordancia positiva media (CPM) y la concordancia porcentual negativa media (CNM), se utilizaron la CPP y la CPN ponderadas por los totales marginales correspondientes. Además, los intervalos de confianza del 95 % para la CPM y la CNM se calcularon utilizando un método de reposición no paramétrico.
- 17.17.3. La Tabla 21 recoge la concordancia de los resultados del estado mutacional global para *FLT3* en SP y MO. Como se muestra en la siguiente tabla, 94 de los 95 pacientes presentaron resultados concordantes en SP y MO. Solo dos arrojaron resultados discordantes. Este resultado se asoció con el resultado de la muestra de MO en el valor de corte clínico (RS = 0,05).

Tabla 21: Concordancia del estado mutacional global para *FLT3* en sangre periférica y médula ósea

SP	MO		Total
	MO+	MO-	
SP+	35	0	35
SP-	1	59	60
Total	36	59	95

- 17.17.4. La Tabla 22 recoge la concordancia entre la MO y la SP usando MO y SP como referencia. Las estimaciones puntuales de CPN, CPP y CPG estuvieron por encima del 97 %. El límite inferior de la CPG en el intervalo de confianza del 95 % fue superior al 94 %, lo que demuestra la concordancia entre los tipos de muestras de MO y SP.

Tabla 22: Concordancia del estado mutacional global para *FLT3* en sangre periférica y en médula ósea

Concordancia	Porcentaje de concordancia (N)	IC del 95 % ⁽¹⁾
CPP MO	97,2 % (35/36)	(85,5 %, 99,9 %)
CPP SP	100 % (35/35)	(90,0 %, 100 %)
CPN MO	100 % (59/59)	(93,9 %, 100 %)
CPN SP	98,3 % (59/60)	(91,1 %, 100 %)
CPG	98,9 % (94/95)	(94,3 %, 100 %)

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

- 17.17.5. La Tabla 23 recoge la concordancia porcentual positiva media (CPM) y la concordancia porcentual negativa media (CNM) para los resultados del CDx obtenidos en sangre periférica y en médula ósea. La CPM (CNM) se calculó como el promedio ponderado de la CPP (CPN) usando SP como referencia y la CPP (CPN) usando MO como referencia. Las estimaciones puntuales de CPM y CNM son del 98,6 % y el 99,2 %. Los límites inferiores de los intervalos de confianza son superiores al 95 % para CPM y CNM, lo que demuestra la concordancia entre los resultados para la SP y la MO.

Tabla 23: Concordancia media del estado mutacional global para *FLT3* en sangre periférica y médula ósea

Medida de la concordancia	Porcentaje de concordancia	IC del 95 % ⁽¹⁾
CPM	98,6 %	(95,1 %, 100,0 %)
CNM	99,2 %	(97,2 %, 100,0 %)

⁽¹⁾ El IC del 95 % se calculó utilizando un método de muestreo con reposición no paramétrico (N=1000)

- 17.17.6. La concordancia del estado mutacional para *FLT3* en sangre periférica y médula ósea es alta, lo que indica que ambos tipos de muestras son adecuados para su uso con LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Hay disponibles análisis pormenorizados de la concordancia entre la sangre periférica y la médula ósea para DIT y DTC en el Resumen de seguridad y rendimiento (280544).

18. Evaluación del rendimiento clínico

18.1. Estudio clínico IVS-056-001 (ensayo clínico ADMIRAL)

18.1.1. Resumen del estudio (IVS-056-001)

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

pruebas de referencia necesarias para evaluar la presencia o la ausencia de mutaciones de *FLT3* por DIT o en DTC. A continuación, se utilizó esta prueba para evaluar LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay con ADN extraído de muestras biológicas recogidas durante la selección e inclusión en el estudio 2215-CL-0301.

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

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

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

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

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

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

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

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

18.1.6. Eficacia (IVS-056-001)

- 18.1.6.1. En el análisis final, la mediana de la SG del grupo que usó el gilteritinib fumarato fue mayor (9,3 meses) que la del grupo que se sometió a quimioterapia antineoplásica de último recurso (5,6 meses) en la población CDx+. Se calculó que el cociente de riesgos instantáneos (CRI) estratificado por regresión de Cox fue de 0,637 (IC del 95 %: 0,488-0,830) para la quimioterapia antineoplásica de último recurso; valor de *p* (orden logarítmico estratificado unilateral) = 0,0004, lo que corresponde a una reducción del riesgo relativo de muerte a favor del gilteritinib fumarato. En la Figura 8 se recoge una curva de Kaplan-Meier al respecto.

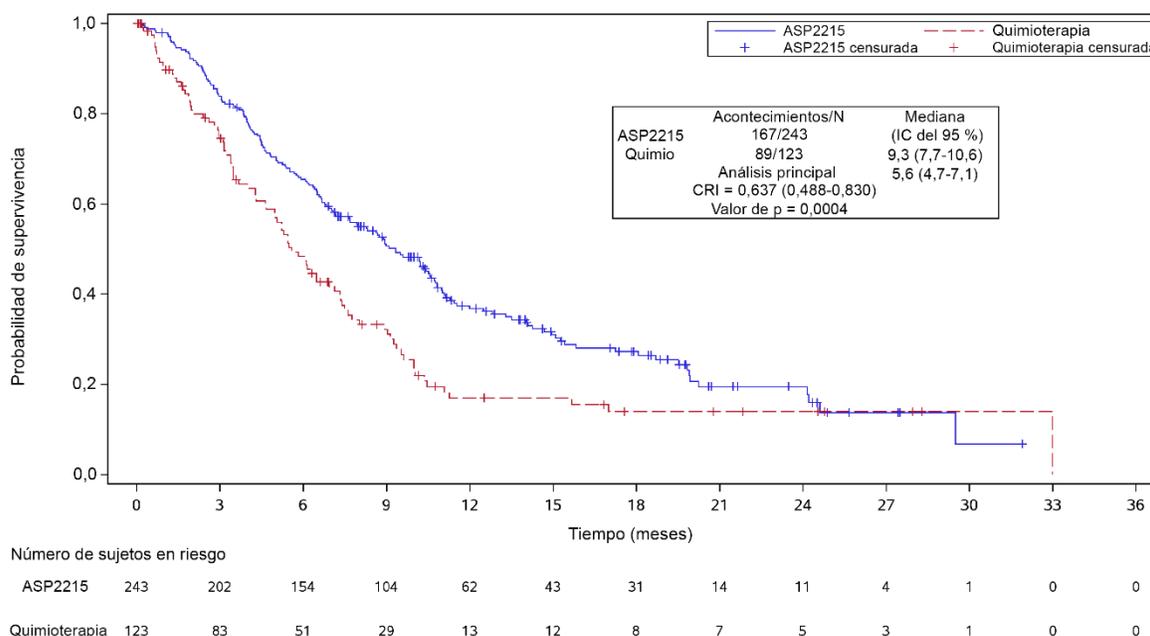


Figura 8: Curva de Kaplan-Meier sobre la supervivencia global

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

Tabla 24: Concordancia entre CDx y la secuenciación con MiSeq

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

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

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

Tabla 25: Tabla de contingencia entre DIT en CDx y la secuenciación con MiSeq

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

Tabla 26: Tabla de contingencia entre DTC en CDx y la secuenciación con MiSeq

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

- 18.1.6.3. Utilizando los datos de concordancia anteriores (Tabla 24), el rendimiento clínico del dispositivo se determinó como se indica en la Tabla 27.

Tabla 27: Rendimiento clínico

Medición del rendimiento clínico	Rendimiento calculado
Sensibilidad diagnóstica	$\frac{300}{300 + 0} = 1$
Especificidad diagnóstica	$\frac{150}{150 + 13} = 0,92$
Razón de verosimilitud positiva	$\frac{1}{1 - 0,92} = 12,5$
Razón de verosimilitud negativa	$\frac{1 - 1}{0,92} = 0$

18.1.7. Conclusiones (IVS-056-001)

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

18.2. Estudio puente fundamental IVS-062-005 (ensayo clínico QuANTUM-First AC220-A-U302)

18.2.1. Visión general del estudio (IVS-062-005)

- 18.2.1.1. Para respaldar la seguridad y eficacia de LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay (CDx), se requirió que se demostrara concordancia clínica entre las muestras con estado DIT en *FLT3* determinado en el análisis del ensayo clínico (Clinical Trial Assay, CTA) AC220-A-U302 y el LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay en la población de intención de tratar. Este estudio puente fundamental corresponde al ensayo clínico de fase III AC220-A-U302 de clorhidrato de quizartinib en pacientes de LMA de diagnóstico reciente con mutaciones por DIT en *FLT3* (QuANTUM-First). Este estudio puente demuestra la eficacia y seguridad del dispositivo y el fármaco cuando los pacientes con LMA se estratifican con el LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay y se tratan con el clorhidrato de quizartinib, que es probable que proporcione un beneficio a los resultados de los sujetos sin exponer a los sujetos a riesgos no razonables. El LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay está pensado para ayudar a los médicos a tomar decisiones sobre el tratamiento para sus pacientes con LMA con mutaciones por DIT en *FLT3*.

18.2.1.2. Descripción del análisis del ensayo clínico

Navigate BP *FLT3*-ITD Mutation Assay (Navigate, análisis del ensayo clínico de Daiichi Sankyo). El Navigate BP *FLT3*-ITD Mutation Assay (Navigate, Daiichi Sankyo Clinical Trial Assay: CTA) fue desarrollado y validado por Navigate BioPharma Services Inc. (Carlsbad, CA). Es una prueba diagnóstica in vitro pensada para la detección cualitativa de mutaciones por duplicación interna en tándem (DIT) en *FLT3* de médula ósea o sangre periférica recogida en tubos K2 (EDTA) usando QIAmp DSP DNA Blood Mini Kit de Qiagen y sometida a reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR). Las mutaciones por DIT en *FLT3* se identifican mediante la amplificación de la región entre los exones 14 y 15 del gen *FLT3* mediante PCR usando una única serie de cebadores de ADN que flanquean la región. Los productos de la PCR se someten entonces a electroforesis capilar y análisis de fragmentos en ABI 3130xl usando el software GeneMapper de ABI para resolver y detectar los productos de la PCR de diferentes tamaños. Los productos de la reacción con mutaciones por DIT de tamaño mayor de 330 pares de bases (pb) así como productos sin mutación (sin mutación por DIT) de 330 pb se detectan mediante el análisis de fragmentos. El porcentaje de mutación (% mutado) o frecuencia alélica variante (variant allele frequency,

VAF) de cada muestra se calcula dividiendo el área bajo la curva (AUC) del pico mutante máximo por la suma de la AUC de los picos mutante y no mutante (330 pb) y multiplicando por 100. Una muestra de paciente se considera positiva si la VAF cumple o excede el punto de corte clínico del 3 %. Este análisis se desarrolló para detectar solamente mutaciones causadas por inserciones de DIT en el gen *FLT3*.

Todas las pruebas se realizan en un laboratorio CLIA siguiendo los reglamentos de CLIA y con la aprobación de un anatomopatólogo del análisis de mutaciones por DIT en *FLT3*.

- 18.2.1.3. El LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay ha sido desarrollado por Invivoscribe como prueba diagnóstica complementaria para ser utilizada como ayuda en la evaluación de pacientes con LMA para quienes se esté considerando el tratamiento con clorhidrato de quizartinib. En este estudio puente se evaluaron la concordancia con el CTA y la eficacia del fármaco al estratificarse mediante el LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 18.2.2. Objetivos del estudio (IVS-062-005)
 - 18.2.2.1. Demostrar concordancia con respecto a la selección de sujetos con duplicación en tándem en *FLT3* entre el CTA y el LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, evaluando el porcentaje de concordancia positivo y negativo (PCP y PCN, respectivamente) entre los dos análisis.
 - 18.2.2.2. Determinar si quizartinib prolonga la supervivencia global (SG) en comparación con placebo en sujetos con LMA de diagnóstico reciente con mutación DIT en *FLT3* según lo determinado por el LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay (población de CTA(+), CDx(+)).
- 18.2.3. Población de pacientes (IVS-062-005)
 - 18.2.3.1. 3468 pacientes se sometieron a selección con el Daiichi Sankyo Clinical Trial Assay para la inscripción en el AC220-A-U302, siendo 1033 proporcionados por el promotor del fármaco para el estudio puente. Muestras de 1029 pacientes cumplieron los criterios de inclusión para las pruebas con el LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. De estos 1029 sujetos, 513 fueron CTA(+) y 516 fueron CTA(-). Una vez finalizadas las pruebas de las muestras con el LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, 1023 sujetos obtuvieron resultados válidos tanto en el CTA como en el CDx y seis sujetos obtuvieron resultados no válidos con el CDx.
- 18.2.4. Análisis de seguridad (IVS-062-005)
 - 18.2.4.1. No se prevé que el LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay cause directamente efectos adversos observados o potenciales, pero los resultados de la prueba podrían tener impacto directo en los riesgos del tratamiento del paciente.
- 18.2.5. Efectividad (IVS-062-005)
 - 18.2.5.1. El LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay demostró concordancia con el CTA y eficacia comparable con el estudio AC220-A-U302.
 - 18.2.5.1.1. El análisis primario demostró:

La concordancia entre LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation y el CTA se demostró a partir de una subserie de 1029 resultados. Las estimaciones puntuales para el PCP y el PCN fueron superiores al 90 %.

Tabla 28: Contingencia entre CDx y CTA

DIT CDx	DIT CTA		Total
	CTA(+)	CTA(-)	
CDx(+)	483	0	483
CDx(-)	27	513	540
No válido	3	3	6
Total	513	516	1029

No válido significa que una muestra se probó en el análisis CDx pero no se obtuvo un resultado válido

La concordancia con resultados no válidos de CDx (IC del 95 %) es:

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

18.2.5.1.2. Efectividad en la población (CTA(+), CDx(+)) (483 sujetos):

Se evaluó la eficacia del clorhidrato de quizartinib sobre la supervivencia global (SG) en la población con resultado positivo en CDx. En la población (CTA(+), CDx(+)), el tratamiento con quizartinib en combinación con la quimioterapia de referencia conllevó una mejora clínicamente relevante en la SG en comparación con el placebo. La mediana de la SG en el grupo de quizartinib fue 29,4 meses (19,1, NE) en comparación con 14,8 meses (13,1, 26,2) para el placebo, lo que conllevó una prolongación de 14,6 meses de la mediana de la SG (valor de p [orden logarítmico estratificado bilateral] = 0,0640). Se estimó un cociente de riesgos instantáneos (CRI) estratificado de 0,794 (0,621, 1,014) para placebo que corresponde a una reducción de riesgo relativo de muerte del 20,6 % a favor de quizartinib. Los resultados fueron comparables a aquellos observados en el estudio QuANTUM-First (AC220-A-U302).

18.2.5.1.2.1. Efectividad en la población de DIT (CTA(+)) (539 sujetos):

Se evaluó la eficacia del clorhidrato de quizartinib sobre la supervivencia global (SG) en la población con resultado positivo en el CTA. En la población de CTA(+), el tratamiento con quizartinib en combinación con la quimioterapia de referencia conllevó una mejora clínicamente relevante en la SG en comparación con placebo. La mediana de la SG en el grupo de quizartinib fue 31,9 meses (21,0, NE) en comparación con 15,1 meses (13,2, 26,2) para placebo, lo que conllevó una prolongación de 16,8 meses de la mediana de la SG (valor de p [orden logarítmico estratificado bilateral] = 0.0324). Se estimó un cociente de riesgos instantáneos (CRI) estratificado de 0,776 (0,615, 0,979) para placebo que corresponde a una reducción de riesgo relativo de muerte del 22,4 % a favor de quizartinib.

18.2.6. Conclusiones (IVS-062-005)

- 18.2.6.1. En general, estos resultados respaldan que LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay identifica la misma población de pacientes con LMA que la inscrita en el ensayo clínico AC220-A-U302 con respecto a las mutaciones genéticas por DIT en *FLT3*.

19. Bibliografía

1. 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.
2. 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.
3. 280544 Summary of Safety and Performance – LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay. www.eudamed.eu/.

20. Servicio técnico y atención al cliente

Datos de contacto



Invivoscribe, Inc.

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | EE. UU.

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

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

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

21. Símbolos

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

	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>		Marcado CE
	Número de catálogo		Fecha de validez
	Volumen de reactivo		Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Número de lote		Fabricante
	Condiciones de conservación		Fecha de fabricación
	Consulte las instrucciones de uso		ADN polimerasa Taq
	Control positivo		Enzima EcoRV
	Control sin molde		NEBuffer r3.1
	Control de extracción		Mezcla maestra
	Revisión		Identificador único del dispositivo
	Representante Autorizado en Suiza		Persona Responsable del Reino Unido

22. Aviso legal

Para avisos legales relacionados con este producto, visite: <https://invivoscribe.com/legal-notice/>

23. Historial de revisiones

Table 29: Historial de revisiones de las instrucciones de uso

Revisión	Fecha de publicación	Cambio
A	Julio de 2023	Publicación inicial
B	Diciembre de 2023	Los requisitos del sistema software aplicables a la versión 1.1.3.IVD fueron actualizadas. La versión del software de recogida de datos (DCS) fue corregida en la Tabla 2. "LeukoStrat CDx FLT3 Software" fue actualizada a nombre completo en PFIGS Instrucciones de Uso. Las instrucciones que explican como cambiar el sistema operativo regional del software v1.1.2.IVD fueron removidas.
C	Agosto de 2024	Adición de VANFLYTA® al uso previsto. Adición de Visión general del estudio puente fundamental a la Evaluación del rendimiento clínico (IVS-062-005). Reemplazo del Aviso legal con enlace a la página web de Avisos legales.
D	Octubre de 2024	La versión del software de recogida de datos (DCS) fue corregida en la Tabla 2.
E	Febrero de 2025	Se han añadido al Apartado 21 símbolos y definiciones correspondientes a otros representantes regionales.
F	Marzo de 2025	Eliminación de la opción de utilizar el software de recogida de datos (DCS) para el análisis. Se incluyó el requisito de utilizar GM v6.0 con el parche B02.