

Instruções de utilização

CE 2797 IVD

## LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay

Para a deteção de duplicação interna em tandem (ITD, Internal Tandem Duplication) e mutações do domínio de tirosina cinase (TKD, Internal Tandem Duplication) no gene da tirosina cinase semelhante a FMS 3 (FMS-like tyrosine kinase 3, *FLT3*).

**IVD** Para diagnóstico *in vitro*



**Ref.<sup>a</sup> catálogo**

**REF**

K4120431

**Produto**

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

**Quantidade**

33 reações

# Índice

<b>1.</b>	<b>NOME COMERCIAL</b> .....	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>UTILIZAÇÃO PREVISTA</b> .....	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>INDICAÇÕES/CONTRAINDICAÇÕES</b> .....	<b>4</b>
<b>4.</b>	<b>GLOSSÁRIO</b> .....	<b>4</b>
<b>5.</b>	<b>RESUMO E EXPLICAÇÃO DO ENSAIO</b> .....	<b>4</b>
<b>6.</b>	<b>PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO</b> .....	<b>5</b>
6.1.	Mutações do tipo duplicação interna em tandem (ITD) de <i>FLT3</i> .....	5
6.2.	Mutações do domínio da tirosina cinase (TKD) de <i>FLT3</i> .....	6
6.3.	Utilizador final e ambiente de utilização .....	6
<b>7.</b>	<b>REAGENTES E MATERIAIS</b> .....	<b>7</b>
<b>8.</b>	<b>INSTRUMENTOS/ACESSÓRIOS</b> .....	<b>10</b>
8.1.	Software (fornecido).....	10
<b>9.</b>	<b>AVISOS E PRECAUÇÕES</b> .....	<b>11</b>
9.1.	Precauções de cibersegurança .....	12
<b>10.</b>	<b>RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS</b> .....	<b>13</b>
10.1.	Precauções .....	13
10.2.	Substâncias Interferentes com a PCR.....	13
10.3.	Requisitos e Manuseamento de Amostras.....	13
<b>11.</b>	<b>PROCEDIMENTO DO ENSAIO</b> .....	<b>13</b>
11.1.	Inspeção das amostras .....	13
11.2.	Preparação para o processamento de amostras.....	13
11.3.	Diluição de amostras clínicas.....	13
11.4.	Isolamento de células mononucleares (CMN) .....	13
11.5.	Contagem de células mononucleares.....	14
11.6.	Preparação de amostras para a realização da extração e isolamento de ADN .....	14
11.7.	Preparar a estação de automatização QIAcube .....	15
11.8.	Extração de ADN .....	15
11.9.	Quantificação e diluição do ADN .....	15
11.10.	Amplificação .....	16
11.11.	Digestão por enzima de restrição (apenas mutação do TKD).....	17
11.12.	Deteção por eletroforese capilar .....	18
11.13.	Preparar solução de padrões de tamanho, se necessário .....	18
11.14.	Preparar a placa de amostras .....	19
11.15.	Configure o PlateMapper com o LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software .....	20
11.16.	Configurar o software do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx.....	28
11.17.	Realizar corridas no analisador genético 3500xL ou 3500xL Dx.....	30
11.18.	Análise de dados com o software GeneMapper .....	30
11.19.	Análise de dados com o Data Collection Software (Software de recolha de dados) .....	32
11.20.	Análise de dados com o LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software .....	33
<b>12.</b>	<b>CONTROLO DE QUALIDADE</b> .....	<b>38</b>
12.1.	Validade da corrida.....	38
12.2.	Validade dos controlos da extração e das amostras .....	38
<b>13.</b>	<b>INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>14.</b>	<b>RETESTAGEM</b> .....	<b>40</b>
14.1.	Corridas inválidas.....	40
14.2.	Controlo da extração inválido em corridas válidas.....	40
14.3.	Amostras inválidas em corridas válidas .....	40
14.4.	Detalhes de falhas e retestagem .....	40
14.5.	Várias falhas numa corrida .....	43
14.6.	Mudança de corante .....	45
<b>15.</b>	<b>LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO</b> .....	<b>45</b>
<b>16.</b>	<b>VALORES ESPERADOS</b> .....	<b>45</b>
16.1.	Tamanho esperado dos produtos amplificados.....	45

<b>17.</b>	<b>AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NÃO CLÍNICO .....</b>	<b>46</b>
17.1.	Sensibilidade analítica – limite do branco (LB) .....	46
17.2.	Sensibilidade analítica.....	46
17.3.	Precisão .....	48
17.4.	Reprodutibilidade interoperador (linhagens celulares) .....	48
17.5.	Reprodutibilidade interoperador (amostras clínicas).....	48
17.6.	Reprodutibilidade interlote e interinstrumento .....	49
17.7.	Substâncias interferentes — exógenas .....	49
17.8.	Substâncias interferentes — endógenas .....	49
17.9.	Substâncias interferentes — fármacos do tratamento.....	49
17.10.	Contaminação cruzada e por arrasto .....	50
17.11.	Quantidade de ADN.....	50
17.12.	Validação de tubos de colheita de sangue com EDTA.....	50
17.13.	Validação do meio de gradiente de densidade .....	50
17.14.	Validação do NEBuffer 3.1.....	50
17.15.	Equivalência: NEBuffer r3.1 vs. NEBuffer 3.1 .....	51
17.16.	Reprodutibilidade e precisão em múltiplos locais .....	51
17.17.	Equivalência de amostras de sangue periférico vs. medula óssea.....	52
<b>18.</b>	<b>AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO CLÍNICO .....</b>	<b>53</b>
18.1.	Estudo clínico IVS-056-001 (ensaio clínico ADMIRAL) .....	53
<b>19.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>56</b>
<b>20.</b>	<b>ASSISTÊNCIA TÉCNICA E APOIO AO CLIENTE.....</b>	<b>56</b>
<b>21.</b>	<b>SÍMBOLOS.....</b>	<b>57</b>
<b>22.</b>	<b>AVISO LEGAL.....</b>	<b>57</b>
<b>23.</b>	<b>HISTÓRICO DE REVISÕES .....</b>	<b>57</b>

## 1. Nome comercial

LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay

## 2. Utilização prevista

O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), concebido para detetar duplicação interna em tandem (ITD) e mutações D835 e I836 do domínio da tirosina cinase (TKD) no gene *FLT3* em ADN genómico extraído de células mononucleares obtidas de sangue periférico, ou aspirados de medula óssea, de doentes diagnosticados com leucemia mieloide aguda (LMA). O Ensaio de Mutações de *FLT3* LeukoStrat CDx pode ser usado como diagnóstico auxiliar para a seguinte terapêutica:

Em regiões onde o XOSPATA® (fumarato de gilteritinib) está disponível, o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay é usado como um auxiliar na avaliação de doentes com LMA para quem está a ser considerado o tratamento com XOSPATA (fumarato de gilteritinib).

O teste qualitativo e não automatizado destina-se a ser utilizado nos Analisadores Genéticos 3500xL ou 3500xL Dx.

## 3. Indicações/Contraindicações

Não há contraindicações identificadas.

## 4. Glossário

<b>LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software</b>	Software de análise dos dados do LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Mutation Assay.
<b>Mutação do tipo duplicação interna em tandem (ITD, Internal Tandem Duplication)</b>	A duplicação e inserção de uma porção do gene <i>FLT3</i> que inclui a região no interior e em torno da região justamembranar do gene <i>FLT3</i> .
<b>CE</b>	Controlo da extração
<b>CSM</b>	Controlo sem molde
<b>CP</b>	Controlo positivo
<b>Razão de sinal (RS)</b>	Calculada dividindo a área do pico mutante pela área do pico selvagem.
<b>Mutação do domínio da tirosina cinase (Tyrosine Kinase Domain, TKD)</b>	Alteração ou alterações em nucleotídeos que resultam em alterações no codão 835 e/ou 836 que são detetadas pela inativação do local de digestão da enzima de restrição EcoRV dentro do domínio da tirosina cinase do gene <i>FLT3</i> .

## 5. Resumo e explicação do ensaio

Geralmente, a leucemia mieloide aguda (LMA) tem um fraco prognóstico. Muitos estudos na LMA demonstraram que a presença de mutações ativadoras de *FLT3* é preditiva de um fraco prognóstico, fazendo da mesma um alvo atrativo para o tratamento.<sup>1,2</sup> O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay visa regiões do gene *FLT3* para identificar mutações do tipo duplicação interna em tandem (ITD) e mutações do domínio da tirosina cinase (TKD), tais como as mutações D835 e I836.

O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay inclui reagentes e software específico do ensaio para determinar se estão presentes mutações de *FLT3* no ADN humano extraído de células mononucleares isoladas de amostras de sangue periférico ou medula óssea do doente. O ADN é amplificado através de PCR, o produto amplificado do TKD é digerido enzimaticamente e os produtos amplificados são detetados através de eletroforese capilar no Analisador Genético 3500xL ou 3500xL Dx. O estado mutacional de *FLT3* é determinado pelo LeukoStrat CDx *FLT3* Software. Uma mutação de *FLT3* do tipo ITD e/ou TKD é notificada como Positiva se a razão de sinal mutante:selvagem alcançar ou exceder o limite de 0,05 (ver secção 13: *Interpretação dos resultados*). Uma representação do fluxo de trabalho é apresentada na Figura 1.

## 6. Princípios do procedimento

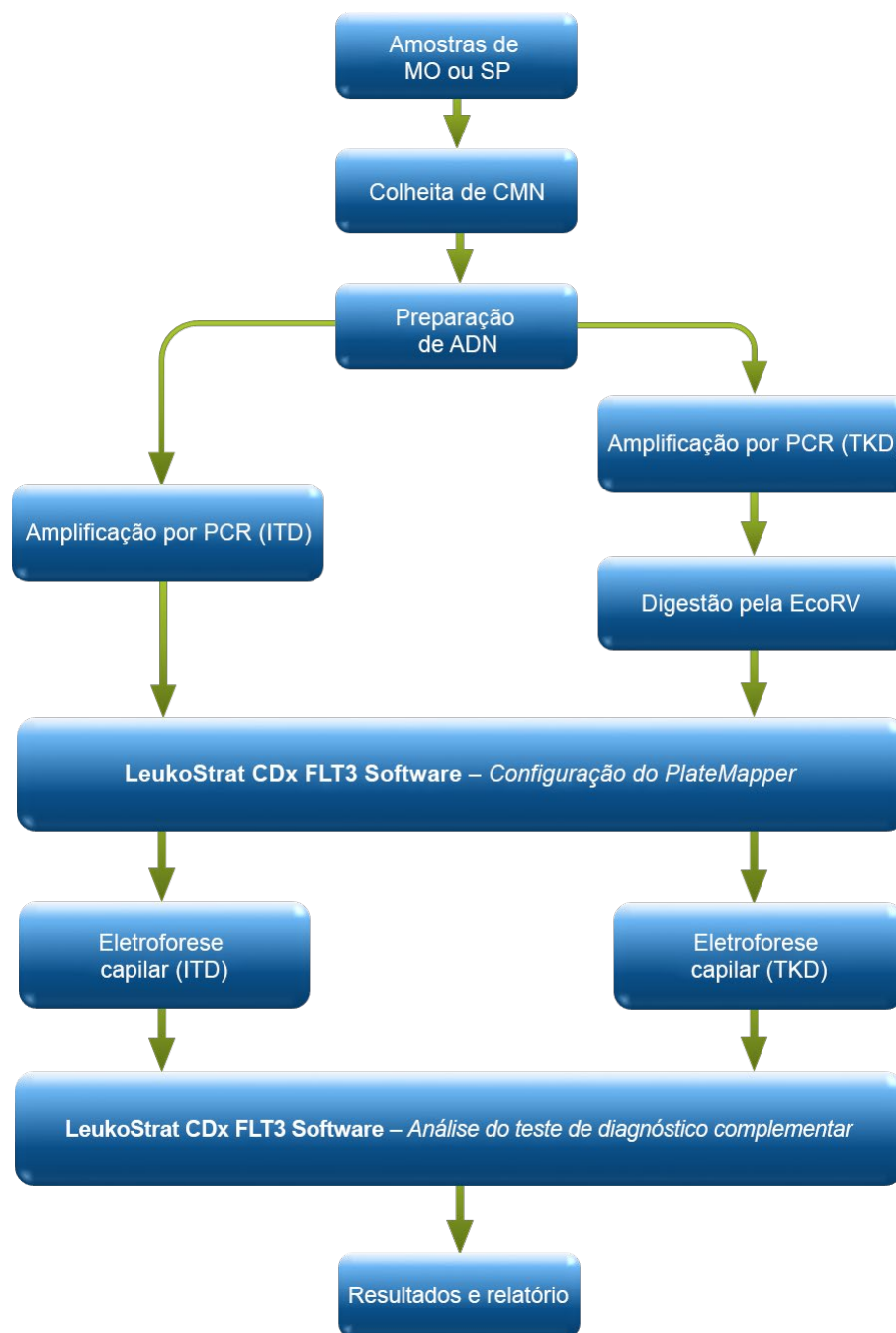


Figura 1: Resumo do fluxo de trabalho

### 6.1. Mutações do tipo duplicação interna em tandem (ITD) de *FLT3*

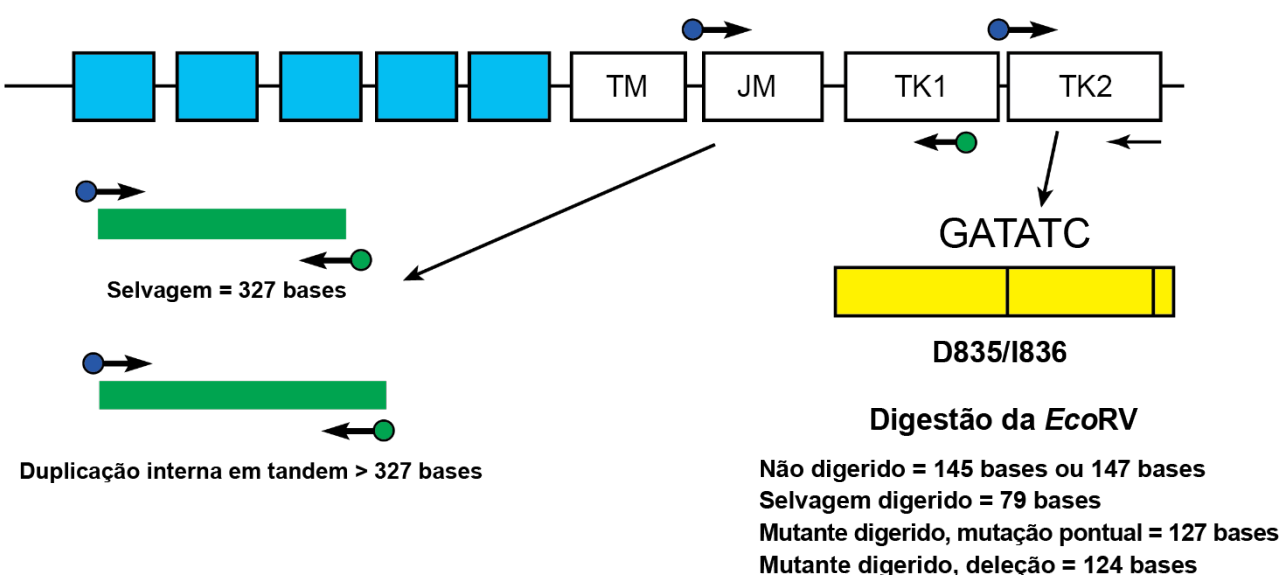
As mutações de extensão ou do tipo ITD de *FLT3* são causadas por uma duplicação e inserção de uma porção do gene *FLT3* que inclui a região no interior e em torno da região justamembranar (JM) do gene *FLT3*. Estas mutações variam ao nível tanto da localização como da extensão da sequência de ADN duplicado inserida. As mutações do tipo ITD resultam na autofosforilação e ativação constitutiva de *FLT3*.<sup>1</sup>

O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay usa primers que estão localizados no interior e em torno da região JM. Os primers para PCR reversa estão marcados com fluorescência com diferentes fluoróforos que servem para confirmar a presença do sinal da amostra. Os alelos de *FLT3* selvagem irão ser amplificados e gerar um produto com um tamanho de  $327 \pm 1$  pb neste ensaio, enquanto os alelos que contenham mutações do tipo ITD irão gerar um produto cujo tamanho excede  $327 \pm 1$  pb (Figura 2).

## 6.2. Mutações do domínio da tirosina cinase (TKD) de *FLT3*

As mutações do TKD de *FLT3* são causadas por substituições e/ou deleções de ácidos nucleicos que resultam numa alteração da sequência de aminoácidos neste centro catalítico altamente conservado. As mutações do TKD, tais como as substituições e deleções em D835 e I836, resultam na autofosforilação e ativação constitutiva de *FLT3*.<sup>2</sup>

Os alelos selvagens do gene *FLT3* incluem um local de digestão da enzima de restrição *EcoRV*. Quando ocorre uma substituição de ácidos nucleicos, o local de restrição da enzima de restrição desaparece e a endonuclease *EcoRV* não é capaz de identificar e digerir ADN neste local. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay usa primers que assentam em ambos os lados da região do TKD. A região alvo de *FLT3* é amplificada usando PCR e depois é realizada uma digestão pela enzima de restrição *EcoRV*. Um dos primers da PCR está marcado com um fluoróforo e o outro contém um local de restrição da *EcoRV* planeado, pelo que ambos os alelos mutantes e selvagens são digeridos. O padrão de digestão identifica a perda da sequência do gene normal e assegura que a digestão ocorreu. Os alelos selvagens do gene *FLT3* produzem produtos de digestão de  $79 \pm 1$  pb, enquanto os alelos mutantes produzem produtos de  $125 \pm 1$  pb ou  $127 \pm 1$  pb provenientes do produto amplificado não digerido original de  $145 \pm 1$  pb ou  $147 \pm 1$  pb, segundo a medição deste ensaio (Figura 2).



**Figura 2:** É ilustrada uma representação da região justamembranar (JM) (TM = transmembranar) e da ansa ativadora do domínio de tirosina cinase (TK) de *FLT3*. As setas negras representam as posições relativas dos primers que visam a região JM e a envoltória da mesma, para mutações do tipo ITD, ou a ansa ativadora do domínio de tirosina cinase, para mutações do TKD. Os pontos coloridos representam fluoróforos nos primers marcados. A caixa amarela tem linhas negras verticais que representam a posição dos locais de digestão da enzima de restrição *EcoRV*.

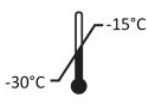
## 6.3. Utilizador final e ambiente de utilização

O dispositivo destina-se apenas ao uso profissional num contexto de laboratório clínico. O uso deste produto tem de estar limitado a pessoal com formação nas técnicas de PCR e na utilização do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

## 7. Reagentes e materiais

**NOTA:** O kit do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay é utilizável até à data de validade do kit indicada no rótulo quando conservado conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1:** Lista de reagentes do kit do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, **REF** K4120431

Referência do catálogo	Nome do reagente	Rótulo do reagente	Temperatura de armazenamento	Quantidade unitária	N.º de unidades/kit
<b>REF</b> R0880280 **	<i>FLT3</i> Extraction Control (Controlo da extração)	<i>FLT3</i> <b>CONTROL EC</b>		1800 µL/frasco	1 frasco
<b>REF</b> B4120151 *	<i>FLT3</i> ITD Master Mix	<i>FLT3</i> ITD <b>MM</b>		1500 µL/frasco	1 frasco
<b>REF</b> B4120161 *	<i>FLT3</i> TKD Master Mix	<i>FLT3</i> TKD <b>MM</b>		1500 µL/frasco	1 frasco
<b>REF</b> R0880260 **	<i>FLT3</i> ITD Positive Control (Controlo positivo para mutações do tipo ITD)	<i>FLT3</i> ITD <b>CONTROL +</b>		100 µL/frasco	1 frasco
<b>REF</b> R0880270 **	<i>FLT3</i> TKD Positive Control (Controlo positivo para mutações do TKD)	<i>FLT3</i> TKD <b>CONTROL +</b>		100 µL/frasco	1 frasco
<b>REF</b> R0930080 **	<i>FLT3</i> No Template Control (Controlo sem molde)	<i>FLT3</i> <b>CONTROL NTC</b>		200 µL/frasco	1 frasco
<b>REF</b> 261942	Taq DNA Polymerase (Polimerase de ADN Taq) (Taq)	<b>TAQ</b>		200 µL/frasco	1 frasco
<b>REF</b> 261944	EcoRV Enzyme (Enzima EcoRV)	<b>EcoRV</b>		200 µL/frasco	1 frasco
<b>REF</b> 261987*	NEBuffer r3.1	<b>NEB3.1</b>		1250 µL/frasco	1 frasco

\*Os frascos abertos das Master Mixes e de NEBuffer r3.1 guardados congelados poderão ser submetidos a até 4 ciclos de congelação/descongelação.

\*\*Os frascos abertos dos controlos guardados congelados poderão ser submetidos a até 8 ciclos de congelação/descongelação.

**Tabela 2:** Reagentes, materiais e equipamentos adicionais exigidos (não fornecidos)

Plataforma de capilares	Reagente/Material	Reagentes/Materiais e Fornecedores	Ref. <sup>a</sup> catálogo	Notas
<b>Analizador genético série 3500xL Dx</b>	<b>Formamida Hi-Di</b>	Thermo Fisher Scientific • Formamida Hi-Di™ (5 mL)	4401457 (1 x 5 mL) 4440753 (4 x 5 mL)	N/A
	<b>Padrões de tamanho LIZ</b>	Thermo Fisher Scientific: • Padrões de tamanho marcados GeneScan™ 600 LIZ™ v2.0	4408399	N/A
	<b>Polímero</b>	Thermo Fisher Scientific: • Polímero POP-7™ para analisadores genéticos 3500/3500xL	4393708	N/A
	<b>Tampão</b>	Thermo Fisher Scientific: • Recipiente de tampão de ânodo (Anode Buffer Container, ABC) série 3500	4393927	N/A
		Thermo Fisher Scientific: • Recipiente de tampão de cátodo (Cathode Buffer Container, CBC) série 3500	4408256	N/A
	<b>Instrumento e software de eletroforese capilar</b>	Thermo Fisher Scientific: • Analizador genético 3500xL com Data Collection Software (Software de recolha de dados) (DCS) v3.0	4405633	Este instrumento não tem marcação CE.
Thermo Fisher Scientific: • Software GeneMapper® v6		A38888	Este software não tem marcação CE.	

**Tabela 2:** Reagentes, materiais e equipamentos adicionais exigidos (não fornecidos)

Plataforma de capilares	Reagente/Material	Reagentes/Materiais e Fornecedores	Ref. <sup>a</sup> catálogo	Notas
<b>Analizador genético série 3500xL Dx</b>	<b>Matriz de capilares</b>	Thermo Fisher Scientific: • Matriz de 24 capilares para analisador genético 3500xL, 50 cm	4404689	N/A
	<b>Septos</b>	Thermo Fisher Scientific: • Septos para contentor de tampão de cátodo (para os analisadores genéticos da série 3500)	4410715	N/A
		Thermo Fisher Scientific: • Septos para analisadores genéticos 3500/3500xL, 96 poços	4412614	N/A
	<b>Conjunto de retentor e base</b>	Thermo Fisher Scientific: Conjunto de retentor e base (padrão) para analisadores genéticos 3500/3500xL, 96 poços	4410228	N/A
	<b>Conjunto de corantes de calibração espectral</b>	Thermo Fisher Scientific: • DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)	4345833	N/A
<b>Analizador genético série 3500xL Dx</b>	<b>Formamida Hi-Di</b>	Thermo Fisher Scientific: • Formamida Hi-Di™ para analisadores genéticos 3500 Dx/ 3500xL Dx (CE-IVD)	4440752 (4 x 5 mL) 4404307 (1 x 5 mL)	N/A
	<b>Padrões de tamanho LIZ</b>	Thermo Fisher Scientific: • Padrões de tamanho marcados GeneScan™ 600 LIZ™ v2.0 Dx	A25794	N/A
	<b>Polímero</b>	Thermo Fisher Scientific: • Polímero POP-7™ para analisadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx	4393709	N/A
	<b>Tampão</b>	Thermo Fisher Scientific: • Contentor de tampão de ânodo para analisadores genéticos 3500 Dx/ 3500xL Dx	4393925	N/A
		Thermo Fisher Scientific: • Contentor de tampão de cátodo para analisadores genéticos 3500 Dx/ 3500xL Dx	4408258	N/A
	<b>Instrumento e software de eletroforese capilar</b>	Thermo Fisher Scientific: • Analisador genético 3500xL Dx da Applied Biosystems (24 capilares) com DCS 3.0	A27856	N/A
		Thermo Fisher Scientific: • Software GeneMapper™ 6, instalação completa	A38888	Este software não tem marcação CE. PN é para Windows 10
	<b>Matriz de capilares</b>	Thermo Fisher Scientific: • Matriz de 24 capilares para analisador genético 3500xL Dx, 50 cm	4404688	N/A
	<b>Septos</b>	Thermo Fisher Scientific: • Septos para contentor de tampão de cátodo para analisadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx	4410716	N/A
		Thermo Fisher Scientific: • Septos para analisadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx, 96 poços	4410700	N/A
	<b>Conjunto de retentor e base para 3500xL Dx</b>	Thermo Fisher Scientific: • Conjunto de retentor e base (padrão) para analisadores genéticos 3500 Dx/3500xL Dx, 96 poços	4410227	N/A
<b>Conjunto de corantes de calibração espectral</b>	Thermo Fisher Scientific: • DS-33 Matrix Standard Kit Dx (Dye Set G5)	A25775	N/A	
<b>Necessário</b>	<b>Pipetas calibradas</b>	• Canal único 5–120 µL • 8 canais 0,2–10 µL, ou equivalente	N/A	Têm de ser capazes de medir com exatidão



**Tabela 2:** Reagentes, materiais e equipamentos adicionais exigidos (não fornecidos)

Plataforma de capilares	Reagente/Material	Reagentes/Materiais e Fornecedores	Ref. <sup>a</sup> catálogo	Notas
para ambas as plataformas de capilares		<ul style="list-style-type: none"> <li>Pipetas P-2M, P-10N, P-20N, P100N, P-200N e P-1000N, ou equivalente</li> </ul>		volumes entre 0,5 µL e 1000 µL.
	<b>Termociclador</b>	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Termociclador de 96 poços Veriti™ Dx, 0,2 mL</li> </ul>	4452300	N/A
	<b>Agitador Vórtex</b>	N/A	N/A	N/A
	<b>Placas ou tubos para PCR</b>	N/A	N/A	Placas contornadas com qualidade para biologia molecular
	<b>Pontas de pipeta com barreira de filtro</b>	N/A	N/A	Com qualidade para biologia molecular sem RNase/DNase/pirogénios
	<b>Microcentrífuga</b>	N/A	N/A	N/A
	<b>Folha de alumínio para placas de 96 poços</b>	N/A	N/A	N/A
	<b>Tiras de 8 tampas para placas de 96 poços</b>	N/A	N/A	N/A
	<b>Água desionizada destilada em recipiente de vidro e com qualidade para biologia molecular ou USP</b>	N/A	N/A	Estévil, sem RNase/DNase
	<b>Extração de ADN</b>	QIAgen: <ul style="list-style-type: none"> <li>QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit</li> </ul>	61104	Inclui tampão AL, tampão AW1, tampão AW2, tampão AE, solvente de protease, protease, tubos de eluição, tubos de lise e colunas de centrifugação
	<b>Isolamento de células mononucleares</b>	Meio de gradiente de densidade	N/A	Densidade: 1,077 g/mL
	<b>Solução salina tamponada</b>	Solução tamponada com fosfatos de Dulbecco (DPBS)	N/A	N/A
	<b>Meio de crescimento</b>	RPMI 1640 com L-glutamina	N/A	N/A
	<b>Contador de células</b>	N/A	N/A	Capaz de contar células nucleadas
	<b>Espectrofotómetro de UV para microvolumes</b>	Espectrofotómetro de UV	N/A	Capaz de medir a absorbância a 260 nm para o cálculo da concentração de ácidos nucleicos
	<b>Álcool etílico/etanol</b>	N/A	N/A	Etanol a 96–100%
<b>Sistema de extração de ADN</b>	QIAgen: <ul style="list-style-type: none"> <li>QIAcube System (220–240 V)</li> <li>QIAcube Connect (220–240 V)</li> </ul>	9001293 9002864	N/A	

**Tabela 3:** Materiais gerais de laboratório (não fornecidos)

Descrição do material
Tubos cónicos de 15 mL
Tubos cónicos de 50 mL
Pipetas serológicas – 5 mL, 10 mL, 25 mL
Panos sem fiapos
Temporizador calibrado
Gelo e balde de gelo
Recipiente para resíduos líquidos
Tubos com superfície antiligação de volume apropriado para diluições e alíquotas de ADN
Tubos de volume apropriado para DPBS, PCR e soluções Master Mix de digestão
Tampas roscadas para tubos de amostras para QIAcube
Pipetas de transferência descartáveis
Pontas de pipetas
Placas de eletroforese capilar de 96 poços, contornadas

## 8. Instrumentos/acessórios

**NOTA:** Este ensaio destina-se a ser usado no analisador genético 3500xL ou 3500xL Dx e no Data Collection Software (Software de recolha de dados) associado instalado em cada instrumento.

**NOTA:** Realize uma manutenção adequada de todos os equipamentos de acordo com as instruções de fabricante:

- Frigorífico capaz de armazenamento entre 2 °C e 8 °C
- Congelador capaz de armazenamento entre -30 °C e -15 °C
- Câmara de ar
- Suporte de pipetas
- Pipetas repetidoras
- Pipetas multicanal, manuais e eletrónicas
- Centrífuga capaz de 1000 x g com rotor basculante e refrigeração
- Centrífuga capaz de 1400 x g com rotor basculante
- Os instrumentos e acessórios acima não são fornecidos

### 8.1. Software (fornecido)

8.1.1. **REF** : K4120441 inclui:

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

A validação da aplicação LeukoStrat Software foi realizada num ecrã configurado para uma resolução de 1920 x 1200, com a definição de visualização “Pequeno – 100%”. Poderão ocorrer problemas de visualização com outras resoluções.

8.1.1.1. Requisitos do computador:

- Sistema operativo: Windows™ 10 Pro ou Windows™ 11 Pro
- Processador: recomenda-se Intel Core 2 Duo ou CPU mais recente
- RAM: 4 GB no mínimo
- Espaço em disco disponível: 5 GB no mínimo
- Uma unidade de CD-ROM
- Adobe Acrobat Reader 2022 ou 2023

## 9. Avisos e precauções



- Leia atentamente as Instruções de Utilização antes de iniciar o procedimento de ensaio e siga rigorosamente cada passo.
- O ensaio está validado apenas para ser usado nos analisadores genéticos 3500xL ou 3500xL Dx e no Data Collection Software (Software de recolha de dados) associado instalado em cada instrumento.
- O ensaio tem de ser utilizado como um sistema. Não substitua os reagentes com os de outros fabricantes.
- A diluição, redução dos volumes de reações de amplificação ou outros desvios deste protocolo podem afetar o desempenho desta análise e/ou anular qualquer sublicença limitada que acompanha a compra deste kit de teste.
- Não misture nem combine reagentes de kits com diferentes números de lote.
- Os materiais são estáveis até à data de validade indicada no rótulo, quando guardados e manuseados como indicado. Não utilize os kits após a sua data de validade.
- Elimine os reagentes não usados e os resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, federais, estatais e locais.
- Registe o número de ciclos de congelação/descongelação de reagentes.
- Todos os procedimentos laboratoriais devem ser realizados com equipamento de proteção individual padrão (luvas, batas de laboratório e proteção ocular). Siga as boas práticas laboratoriais e precauções universais ao trabalhar com amostras. Não pipete com a boca. Não coma, beba ou fume nas áreas de trabalho do laboratório. Lave bem as mãos após manusear as amostras e os reagentes dos ensaios. As amostras devem ser manuseadas em instalações de contenção de segurança biológica aprovadas e só devem ser abertas em câmaras de segurança biológica certificadas.
- Devido à sensibilidade analítica deste teste, deve ser tomado o máximo cuidado para evitar a contaminação dos reagentes ou misturas de amplificação com amostras, controlos ou materiais amplificados. Use pontas de pipeta novas e resistentes a aerossóis para cada amostra e cada reagente. Todos os reagentes devem ser cuidadosamente monitorizados relativamente a sinais de contaminação (p. ex., controlos negativos que originam sinais positivos). Elimine reagentes suspeitos de contaminação.
- Para minimizar a contaminação, utilize luvas limpas ao manusear amostras e reagentes e limpe regularmente as áreas de trabalho e as pipetas antes de realizar a PCR.
- A autoclavagem não elimina a contaminação de ADN. O fluxo de trabalho no laboratório de PCR deve ser unidirecional entre as áreas de trabalho separadas: começar pela preparação das amostras, em seguida, passar para a amplificação e, finalmente, para a deteção. Não coloque ADN amplificado nas áreas designadas para a preparação de amostras.
- Todas as pipetas, pontas de pipeta e equipamentos utilizados numa determinada área devem ser exclusivos dessa área do laboratório.
- Sempre que possível, deve ser utilizado material plástico estéril e descartável, para evitar RNase, DNase ou contaminação cruzada.
- Todos os instrumentos e equipamentos têm de ser sujeitos a manutenção e calibração em conformidade com as recomendações dos fabricantes.
- Assim que a bolsa tiver atingido a temperatura ambiente, examine o interior do gargalo de cada bolsa de polímero POP-7 no ponto de instalação. Certifique-se de que o encaixe da bolsa está isento de polímero seco ou cristalizado. Não instale a bolsa no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx caso se observe cristalização, pois a cristalização poderá afetar o desempenho do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay e do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx. Case se observe cristalização, não instale a bolsa no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx e contacte o apoio ao cliente da Thermo Fisher.
- O desempenho do dispositivo abaixo das expectativas ou a interpretação incorreta dos resultados dos testes poderá originar resultados de mutações de *FLT3* incorretos e, por conseguinte, decisões de gestão de doentes inadequadas no tratamento da LMA<sup>3</sup>.
  - Um resultado falso negativo no teste poderia fazer com que um doente com LMA não sentisse qualquer potencial benefício que possa estar associado à administração de tratamento com fumarato de gilteritinib (XOSPATA<sup>®</sup>). No entanto, o doente receberia quimioterapia intensa como terapêutica padrão para a LMA.
  - Os doentes com um resultado falso positivo no ensaio poderão receber tratamento com fumarato de gilteritinib (XOSPATA<sup>®</sup>) para o qual não há qualquer expectativa de benefício. Para obter informações sobre acontecimentos adversos relacionados com estes tratamentos, consulte as informações de prescrição relevantes da empresa farmacêutica.

**NOTA:** Se forem usadas amostras ou reagentes incorretos e/ou se estas instruções não forem seguidas devidamente, existe um risco de atraso nos resultados, o que poderá originar um atraso no tratamento.

- Qualquer incidente grave que tenha ocorrido associado ao dispositivo será notificado ao fabricante e à autoridade competente no estado-membro do utilizador e/ou do doente.

## 9.1. Precauções de cibersegurança

O LeukoStrat CDx *FLT3* Software não requer uma conexão de rede para funcionar. Para minimizar os riscos de cibersegurança, é recomendado usar o software num computador independente que não está ligado a uma rede. As precauções que se seguem são recomendadas se um computador ligado à rede for usado para instalar o software.

- Os computadores e as redes estão suscetíveis a um risco de segurança se não forem protegidos e atualizados ativamente. Uma proteção adequada do computador e da rede ajuda a garantir que os dados não são comprometidos, perdidos ou danificados devido a ciber-riscos evitáveis. Equipe todos os computadores com software antivírus atualizado e ativo.
- Filtre e proteja o tráfego da rede com uma firewall.
- Mantenha os dados em computadores locais para reduzir riscos de cibersegurança que possam estar presentes na transferência de dados sensíveis numa rede.
- Instale o software apenas para contas de utilizadores locais sem privilégios de administrador para evitar o uso não autorizado do software.
- Assegure-se de que o Windows e o Adobe Acrobat Reader estão sempre atualizados com os mais recentes patches de segurança disponíveis.
- Remova todo o software não essencial do computador e desabilite o acesso ao navegador da Internet.
- Certifique-se de que o sistema operativo do computador bloqueia automaticamente após um período de inatividade do utilizador (p. ex., 5 min).
- Instale apenas as atualizações que tenham sido obtidas diretamente do fabricante (ou seja, da Invivoscribe Inc.). A instalação de atualizações de segurança segue o mesmo procedimento que a instalação de software.
- É recomendado efetuar uma cópia de segurança da instalação do software e de todos os resultados produzidos pelo software para prevenir a perda de dados.
- Certifique-se de que o leitor de ficheiros PDF no Windows está definido para o Adobe Acrobat Reader. A abertura de relatórios de amostras e corridas num navegador da Internet poderá originar riscos de cibersegurança dos dados de doentes.
- O LeukoStrat CDx *FLT3* Software foi validado com os softwares antivírus que se seguem:
  - Symantec Endpoint Protection versão 14.3
  - McAfee Endpoint Security versão 10.7
  - ESET Endpoint Security versão 10.0

## 10. Recolha e preparação de amostras

### 10.1. Precauções

- As amostras biológicas de seres humanos podem conter materiais potencialmente infecciosos. Todas as amostras devem ser manuseadas de acordo com o programa de Agentes Patogénicos Transmitidos pelo Sangue do seu instituto e/ou de acordo com o Nível 2 de Biossegurança.
- O ensaio está validado para sangue e medula óssea anticoagulados com heparina sódica ou EDTA.

### 10.2. Substâncias Interferentes com a PCR

- Quelantes de catiões divalentes
- Pontas de pipeta de baixa retenção
- EDTA (não significativo em baixas concentrações)

### 10.3. Requisitos e Manuseamento de Amostras

- É necessário pelo menos 1 mL de sangue periférico ou 0,25 mL de medula óssea anticoagulado com heparina sódica ou EDTA para o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- As amostras podem ser guardadas entre 2 °C e 8 °C durante até 7 dias antes da testagem.
- A integridade e o conteúdo dos tubos de amostras não podem ser comprometidos (nomeadamente, congelados durante a expedição).

## 11. Procedimento do Ensaio

### 11.1. Inspeção das amostras

- Desembale as amostras de sangue periférico (SP) e/ou aspirado de medula óssea (MO) e rejeite todas as amostras que não cumpram os requisitos listados na secção 10.3.

### 11.2. Preparação para o processamento de amostras

- Realize o processamento de amostras numa área de trabalho de processamento de amostras designada.
- Transfira aproximadamente 14 mL de meio RPMI-1640 por amostra para tubos cónicos de 50 mL rotulados. Deixe o meio aquecer à temperatura ambiente durante pelo menos 1,75 horas.
  - Se o meio RPMI-1640 refrigerado estiver aliquotado em tubos cónicos de 15 mL, aqueça à temperatura ambiente durante pelo menos 45 minutos.
- Para cada amostra, transfira 3 mL de meio de gradiente de densidade para um tubo cónico de 15 mL rotulado.
  - Se o meio de gradiente de densidade estava guardado entre 2 °C e 8 °C, aqueça as alíquotas de meio de gradiente de densidade à temperatura ambiente durante 1 hora antes da utilização.
- Transfira aproximadamente 200 µL de DPBS por amostra para um tubo de volume apropriado rotulado e deixe o mesmo aquecer à temperatura ambiente durante pelo menos 45 minutos antes da utilização.

### 11.3. Diluição de amostras clínicas

**NOTA:** Estão incluídas neste manual instruções para usar um QIAcube para a extração de ADN. Um QIAcube é recomendado, mas não necessário. Se for usado um QIAcube, certifique-se de que é reservado um espaço para o controlo de extração.

- Misture os tubos das amostras invertendo-os 4 a 6 vezes. Adicione alíquotas das amostras (1–3 mL de sangue periférico ou 0,25–0,75 mL de medula óssea) a tubos cónicos de 15 mL rotulados de forma exclusiva.
- Adicione meio RPMI-1640 a cada alíquota de amostra até perfazer o volume total de 6 mL. Tape bem os tubos e misture delicadamente invertendo-os 3 a 5 vezes ou carregue e esvazie a pipeta até a mistura ter uma consistência uniforme.
- Os eventuais restos das amostras poderão ser guardados entre 2 °C e 8 °C.

### 11.4. Isolamento de células mononucleares (CMN)

- Usando uma pipeta de transferência, deposite delicadamente a amostra de sangue periférico ou medula óssea diluída no topo do meio de gradiente de densidade. Incline o tubo que contém o médio de gradiente de densidade enquanto pipeta muito lentamente a amostra no topo para prevenir a mistura de camadas.
- Depois de pipetar a amostra completa, endireite o tubo delicadamente para uma posição vertical e tape-o bem.
- Centrifugue os tubos cónicos de 15 mL nas condições que se seguem, certificando-se de que o travão está totalmente desligado:
  - Força = 400 x g (RCF)
  - Tempo = 30 minutos

- Temperatura = 20 °C
  - Aceleração/desaceleração = mínimo
- 11.4.4. Para cada amostra a ser processada, transfira 6 mL de meio RPMI-1640 para um novo tubo cônico de 15 mL rotulado.
- 11.4.5. Depois da centrifugação, use uma pipeta de transferência para aspirar lentamente a camada de CMN ou até terem sido retirados não mais de 3 mL.
- 11.4.6. Dispense a suspensão da camada de CMN recolhida no tubo cônico de 15 mL devidamente rotulado contendo 6 mL de meio RPMI-1640. Tape o tubo e misture delicadamente invertendo-o 3 a 5 vezes.
- 11.4.7. Centrifugue os tubos cônicos nas condições que se seguem:
- Força = 355–364 x g (RCF)
  - Tempo = 10 minutos
  - Temperatura = 20 °C
  - Aceleração/desaceleração = máximo
- 11.4.8. Verta o sobrenadante, separando-o do pellet de células, mediante inversão do tubo apenas uma vez para depois voltar a colocá-lo na posição vertical. Ressuspenda o pellet no líquido remanescente batendo no tubo 10 a 15 vezes ou até o pellet ficar ressuspense.
- 11.4.9. Adicione 1 mL de meio RPMI-1640 ao pellet de células ressuspense. Tape o tubo e misture delicadamente batendo no tubo 6 a 8 vezes.
- 11.4.10. Coloque os tubos das amostras num banho de água com gelo até serem concluídas as contagens de células mononucleares.

### 11.5. Contagem de células mononucleares

- 11.5.1. Obtenha contagens de células mononucleares usando um sistema de contagem de células adequado.
- 11.5.2. Minimizar o volume consumido para as contagens de células com vista a garantir que é salvaguardada uma quantidade adequada de ADN para o ensaio.
- Elimine a amostra usada para a contagem de células.

### 11.6. Preparação de amostras para a realização da extração e isolamento de ADN

- 11.6.1. Se a concentração reportada for  $\leq 5$  milhões de células/mL, é processado o volume total da suspensão de células. Continue para o passo 11.6.3.
- 11.6.2. Se a concentração reportada for  $> 5$  milhões de células/mL, calcule o volume de amostra que contém 5 milhões de células vivas ( $V_i$ ), pois as colunas de centrifugação do QIAcube apenas conseguem albergar uma quantidade de células  $\leq 5$  milhões.
- 11.6.2.1. Use a equação  $C_i V_i = C_f V_f$  para resolver o  $V_i$  para cada uma destas amostras.
- $C_i$  = concentração de células (células/mL) proveniente da contagem de CMN
  - $C_f$  = concentração final (5 milhões de células/mL)
  - $V_f$  = volume final (1 mL)
  - $V_i = \frac{5\,000\,000 \frac{\text{células}}{\text{mL}} \times 1\text{ mL}}{C_i}$
- 11.6.2.2. Use a equação  $V_f - V_i$  para resolver o volume de meio RPMI-1640 a acrescentar para  $V_i$  perfazer um volume de 1000  $\mu\text{L}$ .
- 11.6.2.3. Misture delicadamente os tubos que contêm as amostras com uma quantidade de células  $> 5$  milhões/mL batendo nos tubos 6 a 8 vezes.
- 11.6.2.4. Transfira os volumes calculados para um tubo cônico de 15 mL rotulado para cada amostra.
- 11.6.3. Centrifugue os tubos das amostras cônicos de 15 mL que contêm as suspensões de células nas condições que se seguem:
- Força = 355–364 x g (RCF)
  - Tempo = 10 minutos
  - Temperatura = 20 °C
  - Aceleração/desaceleração = máximo
- 11.6.4. Usando uma pipeta de transferência, aspire o sobrenadante dos pellets de células. Poderá ficar um pequeno volume de meio.
- 11.6.5. Bata nos tubos cônicos de 15 mL 10 a 15 vezes ou até que os pellets se soltem dos tubos.
- 11.6.6. Adicione 200  $\mu\text{L}$  de DPBS e misture delicadamente batendo no tubo 10 a 15 vezes para ressuspender as células. Coloque estas amostras tapadas no banho de água com gelo.

### 11.7. Preparar a estação de automatização QIAcube

**NOTA:** Estão incluídas neste manual instruções para o uso de um QIAcube para a extração de ADN. Um QIAcube é recomendado, mas não necessário. A extração de ADN pode ser realizada com o minikit para ADN de sangue QIAgen DSP sem um QIAcube.

- 11.7.1. Todos os passos da estação de automatização QIAcube, incluindo os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração, limpeza e manutenção, são executados de acordo com as instruções do fabricante, salvo indicação em contrário a seguir.
  - 11.7.1.1. Siga as orientações da QIAgen relativas à realização de manutenção na estação de automatização QIAcube, com uma exceção. Realize o teste de estanquidade mensalmente em vez de a cada 6 meses.
- 11.7.2. Prepare a estação de automatização QIAcube para a utilização, carregando materiais e reagentes no instrumento.
  - 11.7.2.1. Um QIAcube é capaz de processar até 12 tubos; no entanto, um dos espaços é reservado para o controlo da extração (usado como controlo de contaminação da extração e controlo negativo da PCR). Não é possível processar 1 ou 11 tubos devido a um desequilíbrio da centrífuga.
  - 11.7.2.2. Poderão ser usados tubos de brancos, utilizando DPBS, se o número de extrações necessárias, incluindo o controlo da extração, corresponder a 11 tubos.
- 11.7.3. Retire um tubo de controlo da extração (CE) do armazenamento entre -30 °C e -15 °C e descongele-o à temperatura ambiente. Os tubos de CE poderão ser colocados de novo no congelador depois da utilização. Registe o número de ciclos de congelação/descongelação.
- 11.7.4. Agite no vórtex o tubo de CE à velocidade MÁX. durante 5 a 15 segundos. Centrifugue o tubo durante 2 a 5 segundos se houver líquido presente na tampa. Adicione 200 µL do controlo da extração para um tubo de amostra. Este tubo de CE poderá ser tapado e guardado entre 2 °C e 8 °C até a corrida estar pronta.

### 11.8. Extração de ADN

**NOTA:** Estão incluídas neste manual instruções para usar um QIAcube para a extração de ADN. Um QIAcube é recomendado, mas não necessário. A extração de ADN pode ser realizada com o minikit para ADN de sangue QIAgen DSP sem um QIAcube.

- 11.8.1. Carregue para a pipeta e esvazie da mesma as suspensões de células (provenientes do passo 11.6.6) 4 a 6 vezes para ressuspender as células. Transfira todo o volume das suspensões de células em DPBS para tubos de amostras. Certifique-se de que a maior parte da solução está no fundo do tubo.
- 11.8.2. Coloque o tubo de amostra do controlo da extração na última posição da corrida.
- 11.8.3. Carregue todos os tubos de amostras restantes, os reagentes e a solução de protease alíquotada no instrumento.
- 11.8.4. Inicie a corrida, certificando-se de que são realizadas as seleções que se seguem.
  - 11.8.4.1. Use o protocolo para QIAamp DNA Blood Mini.
  - 11.8.4.2. Selecione **Blood** (sangue) ou **body fluid** (fluido corporal) como material de base.
  - 11.8.4.3. Defina o *Elution volume* (volume de eluição) para **100 µL**.
- 11.8.5. Quando a extração estiver completa, tape os tubos das amostras de ADN e guarde-os entre 2 °C e 8 °C até a quantificação ser realizada.

### 11.9. Quantificação e diluição do ADN

- 11.9.1. Todos os passos do espectrofotómetro de UV para microvolumes, incluindo os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração, limpeza e manutenção, são executados de acordo com as instruções do fabricante, salvo indicação em contrário a seguir.
- 11.9.2. Agite no vórtex os tubos das amostras de ADN à velocidade MÁX. durante 5 a 15 segundos. Usando uma microcentrífuga, centrifugue os tubos das amostras de ADN durante 2 a 5 segundos para remover o líquido das tampas.
- 11.9.3. Estabeleça o zero do instrumento usando 2 µL de tampão AE.
- 11.9.4. Efetue uma só medição de 2 µL de cada amostra de ADN.
- 11.9.5. Se a concentração de uma amostra de ADN tiver uma leitura  $\leq 9,4$  ng/µL, volte a quantificar a amostra de ADN mais duas vezes usando novas alíquotas de 2 µL. Certifique-se de que a amostra está bem misturada para evitar leituras pouco exatas no espectrofotómetro de UV para microvolumes. A média destas três leituras é considerada a concentração de ADN final.

**NOTA:** Se o valor da quantificação final for  $\leq 9,4$  ng/µL, a amostra de ADN não pode ser testada no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Processe de novo a amostra para obter um ADN satisfatório.

**NOTA:** Se o valor da quantificação final do controlo da extração for  $\leq 9,4$  ng/µL, as amostras de ADN associadas não podem ser testadas no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Processe de novo estas amostras para obter um ADN satisfatório.



- 11.9.6. As amostras de ADN poderão ser guardadas não diluídas entre -30 °C e -15 °C durante até um ano. Alternativamente, as amostras de ADN, não diluídas ou diluídas a 10 ng/μL, poderão ser guardadas entre 2 °C e 8 °C durante até 7 dias.

**NOTA:** O ADN não diluído poderá ser submetido a até cinco (5) ciclos de congelação/descongelação.

- 11.9.7. As amostras de ADN com concentração  $\geq 10,5$  ng/μL têm de ser diluídas a 10 ng/μL em tampão AE usando tubos com superfície antiligação. Usando a equação  $C_i V_i = C_f V_f$ , resolva o  $V_i$  depois de seleccionar o volume final ( $V_f$ ) da Tabela 4.

- $V_i = \frac{(V_f \times 10 \frac{ng}{\mu L})}{C_i}$
- $C_i$  = concentração de ADN proveniente da leitura no espectrofotómetro de UV para microvolumes
- $C_f$  = concentração de ADN final (10 ng/μL)
- $V_i$  = volume de ADN não diluído a diluir
- $V_f$  = volume final de ADN diluído (proveniente da Tabela 4)
- $V_f - V_i$  = quantidade de tampão AE a adicionar ao  $V_i$

**Tabela 4:** Determinação de volumes finais em função do valor da quantificação

Concentração de ADN proveniente do espectrofotómetro de UV para microvolumes ( $C_i$ )	Volume final ( $V_f$ )
$C_i \leq 9,4$ ng/μL	Não testável
$9,5 \leq C_i \leq 10,4$ ng/μL	Testar conforme está
$10,5 \leq C_i \leq 50,4$ 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. Amplificação

**NOTA:** Realize todos os passos desta secção no mesmo dia para uma corrida de ITD ou TKD.

**NOTA:** Minimizar a quantidade de exposição à luz das Master Mixes.

**NOTA:** Minimizar a quantidade de tempo que a Taq fica fora do armazenamento entre -30 °C e -15 °C.

- 11.10.1. Realize todos os passos do termociclador Veriti Dx, incluindo os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração, limpeza e manutenção, de acordo com as instruções do fabricante, salvo indicação em contrário a seguir.
- 11.10.2. Deixe as Master Mixes (ITD Master Mix e TKD Master Mix) descongelarem à temperatura ambiente. Retire os tubos de controlo (controlo positivo para ITD, controlo positivo para TKD, controlo da extração e controlo sem molde) do armazenamento apropriado e descongele à temperatura ambiente. Volte a colocar os tubos de controlo no congelador depois da utilização, registando o número de ciclos de congelação/descongelação. Enquanto os reagentes estiverem a aquecer à temperatura ambiente, rotule placas de 96 poços separadas com “PCR para ITD” ou “PCR para TKD”, conforme aplicável, e um identificador exclusivo.

**NOTA:** Corra todas as amostras na mesma placa de PCR que o controlo da extração associado.

- 11.10.3. Determine o número de poços das placas (amostras, controlos positivos para TKD, controlos positivos para ITD, controlos da extração e controlo sem molde) a serem testados nas placas de ITD e TKD. O número total de poços das placas a serem testados por placa de ITD ou TKD = X. Para evitar variações ao pipetar pequenos volumes de reagente, o valor mínimo de X é dois (2).

11.10.3.1. Calcule os volumes de Master Mix e de Taq necessários:

- Volume total de Master Mix =  $45 \mu\text{L} \times (X + 3)$
- Volume total de Taq =  $0,2 \mu\text{L} \times (X + 3)$
- As três (3) amostras adicionais são adicionadas a X para ter em consideração erros de pipetagem.

- 11.10.4. Agite no vórtex a Master Mix, os controlos e os tubos das amostras de ADN à velocidade MÁX. durante 5 a 15 segundos.
- 11.10.5. Retire a Taq do armazenamento entre -30 °C e -15 °C. Não agite no vórtex.
- 11.10.6. Usando uma microcentrifuga, centrifugue os tubos todos (incluindo da Taq) durante 2 a 5 segundos para remover o líquido das tampas.
- 11.10.7. Adicione os volumes calculados de Master Mix e de Taq a tubos de volume apropriado rotulados para as placas de ITD e TKD.
- 11.10.8. Tape os tubos e agite-os no vórtex à velocidade MÁX. durante 5 a 15 segundos para misturar. Use uma microcentrifuga para centrifugar durante 2 a 5 segundos, sempre que possível. Coloque a Taq de novo no armazenamento entre -30 °C e -15 °C.
- 11.10.9. Transfira 45 μL da mistura de Master Mix e Taq para os poços apropriados do esquema da placa de PCR.
- 11.10.10. Adicione 5 μL das amostras de ADN a 10 ng/μL e dos controlos aos poços apropriados da placa de 96 poços de acordo com o esquema da placa de PCR.
- 11.10.11. Vede as colunas da placa de PCR com tiras para poços. Centrifugue a placa de 96 poços a  $1400 \times g$  durante 1 minuto.



- 11.10.12. Coloque a placa de PCR num termociclador Veriti Dx e feche a tampa. Programe o termociclador com os passos listados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Programas do termociclador para amplificação por PCR

Passo	Programa <i>FLT3</i> ITD CDx	Programa <i>FLT3</i> TKD CDx
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	Repetir os passos 2 a 4, 24 vezes	Repetir os passos 2 a 4, 28 vezes
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 ∞
Intensidade da rampa 75%.		

- 11.10.13. Pressione **Run** (Correr) para continuar para o ecrã seguinte. Certifique-se de que a definição do volume da reação é de 50 µL, que a definição da temperatura da cobertura é de 105,0 °C e que a cobertura será aquecida durante a corrida. Pressione **Start Run Now** (Iniciar corrida agora) para começar a corrida.
- 11.10.14. Guarde os reagentes e o ADN restantes. Guarde as Master Mixes abertas entre -30 °C e -15 °C. Registe o número de ciclos de congelação/descongelação.
- 11.10.15. Depois de concluir o protocolo da PCR, a placa de PCR poderá ser guardada entre 2 °C e 8 °C durante até 72 horas. Caso contrário, para as placas de TKD, continue para a secção 11.11: *Digestão por enzima de restrição (apenas mutação do TKD)* e, para as placas de ITD, continue para a secção 11.12: *Deteção por eletroforese capilar*.

### 11.11. Digestão por enzima de restrição (apenas mutação do TKD)

- NOTA:** Realize todos os passos desta secção no mesmo dia.
- NOTA:** Realize a digestão pela enzima de restrição apenas nos produtos amplificados do TKD.
- NOTA:** Minimize a quantidade de tempo que a EcoRV fica fora do armazenamento entre -30 °C e -15 °C.

- 11.11.1. Deixe o tubo de NEBuffer r3.1 descongelar à temperatura ambiente.
- 11.11.2. Enquanto os reagentes estiverem a aquecer à temperatura ambiente, rotule uma placa de 96 poços com “digestão do TKD” e um identificador exclusivo.
- 11.11.3. Determine o número de poços da placa (amostras e controlos) a serem utilizados para digestão na placa. O número total de amostras a serem digeridas é = Y.
- Para prevenir variações ao pipetar pequenos volumes de reagente, o valor mínimo de Y é de quatro (4).
- 11.11.3.1. Calcule os volumes de NEBuffer r3.1 e EcoRV necessários.
- Volume total de NEBuffer r3.1 = 1,1 µL × (Y + 6)
  - Volume total de EcoRV = 0,5 µL × (Y + 6)
  - As seis (6) amostras adicionais são adicionadas a Y para ter em consideração erros de pipetagem.
- 11.11.4. Agite no vórtex o tubo de NEBuffer r3.1 à velocidade MÁX. durante 5 a 15 segundos.
- 11.11.5. Retire a EcoRV do armazenamento entre -30 °C e -15 °C. Não agite no vórtex.
- 11.11.6. Usando uma microcentrifuga, centrifugue os tubos todos (incluindo da EcoRV) durante 2 a 5 segundos para remover o líquido das tampas.
- 11.11.7. Adicione os volumes calculados de NEBuffer r3.1 e EcoRV a um tubo de volume apropriado.
- 11.11.8. Misture a solução carregando e esvaziando a pipeta 5 a 10 vezes. Coloque a EcoRV de novo no armazenamento entre -30 °C e -15 °C.
- 11.11.9. Transfira 1,5 µL da solução da mescla de digestão para os poços apropriados da placa de digestão.
- 11.11.10. Retire a placa de PCR para TKD do termociclador ou do armazenamento entre 2 °C e 8 °C (a placa não tem de aquecer até à temperatura ambiente) e centrifugue-a a 1400 × g durante 1 minuto.
- 11.11.11. Adicione 8,5 µL das amostras da placa de PCR para os poços apropriados da placa de digestão. Vede as colunas da placa de digestão com tiras de tampas.
- 11.11.12. Centrifugue a placa a 1400 × g durante 1 minuto.
- 11.11.13. Coloque a placa de digestão num termociclador Veriti Dx e feche a tampa.
- 11.11.14. Programe o termociclador com os passos listados abaixo (intensidade da rampa 75%).
- Passo 1: 37 °C durante 1 hora
  - Passo 2: 65 °C durante 10 minutos
  - Passo 3: 4 °C durante ∞

- 11.11.15. Pressione **Run** (Correr) para continuar para o ecrã seguinte. Certifique-se de que a definição do volume da reação é de  $10 \mu\text{L}$ , que a definição da temperatura da cobertura é de  $105,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e que a cobertura será aquecida durante a corrida. Pressione **Start Run Now** (Iniciar corrida agora) para começar a corrida.
- 11.11.16. Depois de concluir o protocolo da digestão, a placa de digestão poderá ser guardada entre  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  durante até 72 horas, reduzindo ao mínimo a exposição à luz. Caso contrário, continue para a secção *Deteção por eletroforese capilar* (secção 11.12).

## 11.12. Deteção por eletroforese capilar

**NOTA:** Minimize a quantidade de tempo que o tubo de padrões de tamanho LIZ fica fora do armazenamento entre  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**NOTA:** Os instrumentos 3500xL e 3500xL Dx correm conjuntos de 24 capilares, designados de injeção, que compreende três (3) colunas de oito (8) linhas numa placa de 96 poços. Cada capilar corresponde a um poço. Não há injeções parciais, embora as mesmas possam ser programadas de forma independente.

- 11.12.1. Todos os passos dos instrumentos 3500xL e 3500xL Dx, incluindo os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração, limpeza e manutenção, são executados de acordo com as instruções do fabricante, salvo indicação em contrário a seguir.
- 11.12.2. Os ensaios de ITD e TKD têm de ser corridos em injeções diferentes com condições de injeção diferentes. As condições para ITD e TKD dos instrumentos 3500xL e 3500xL Dx estão listadas na Tabela 6 abaixo. Estas definições são fornecidas como ficheiros XML que podem ser importados e guardados nos instrumentos ABI 3500xL e 3500xL Dx para futura utilização.

**Tabela 6:** Condições dos analisadores genéticos 3500xL e 3500xL Dx

Parâmetro	Parâmetros para o ensaio ITD CDx	Parâmetros para o ensaio TKD CDx
Tempo de injeção	12 s	7 s
Tensão da injeção	1,2 kV	1,0 kV
Comprimento dos capilares	50 cm	
Polímero	POP-7	
Conjunto de corantes	G5	
Temperatura da estufa	60 °C	
Tempo de corrida	1630 s	
Tensão da corrida	19,5 kV	
Tempo de pré-corrida	180 s	
Tensão da pré-corrida	15 kV	
Atraso dos dados	1 s	

- 11.12.3. Clique em **Refresh** (Atualizar) para atualizar o tempo dos consumíveis no instrumento e o número de injeções realizadas no painel de controlo do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx. Verifique o painel de controlo do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx para garantir que os tampões, o polímero e o capilar não excederam o respetivo tempo máximo permitido no instrumento para este ensaio, listado na Tabela 7. Verifique que o número de amostras (não apenas injeções) restantes para o POP-7 é suficiente para a corrida. Se um componente consumível tiver de ser substituído, realize a manutenção necessária antes de continuar.

**Tabela 7:** Tempos máximos permitidos no instrumento; materiais para instrumento 3500xL ou 3500xL Dx

Material para instrumento 3500xL (Dx)	Tempo máximo permitido no instrumento
Polímero POP-7	7 dias
Tampão do ânodo	7 dias
Tampão do cátodo	7 dias
Matriz de capilares para 3500xL ou Matriz de capilares para 3500xL Dx	400 injeções ou 160 injeções

## 11.13. Preparar solução de padrões de tamanho, se necessário

- 11.13.1. A solução de padrões de tamanho é composta por uma mistura de padrões de tamanho LIZ e formamida Hi-Di.
- 11.13.2. Retire um tubo da solução de padrões de tamanho do armazenamento entre  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ , se disponível, e continue para o passo 11.13.6. Caso contrário, prepare um tubo de solução de padrões de tamanho realizando os três passos que se seguem.
- 11.13.3. Deixe um frasco de formamida Hi-Di descongelar à temperatura ambiente. Retire um tubo de padrões de tamanho LIZ do armazenamento.
- 11.13.4. Agite no vórtex os tubos à velocidade MÁX. durante 5 a 15 segundos. Centrifugue os tubos durante 2 a 5 segundos numa microcentrífuga.

- 11.13.5. Adicione 56 µL de padrões de tamanho LIZ a 1 mL de formamida Hi-Di. Rotule o tubo de solução de padrões de tamanho com a data.
- 11.13.6. Agite no vórtex o tubo de solução de padrões de tamanho à velocidade MÁX. durante 5 a 15 segundos. Centrifugue o tubo com a mistura durante 2 a 5 segundos numa microcentrífuga. Qualquer solução não utilizada pode ser guardada entre 2 °C e 8 °C durante até 7 dias. Elimine após 7 dias.

#### 11.14. Preparar a placa de amostras

- 11.14.1. Centrifugue a placa de 96 poços da PCR para ITD e/ou da digestão do TKD a 1400 × g durante 1 minuto.
- 11.14.2. Rotule uma placa de 96 poços com EC para ITD e/ou EC para TKD, conforme aplicável, e um identificador exclusivo.

**NOTA:** Ambos os ensaios de ITD e TKD poderão ser corridos na mesma placa, mas têm de ser separados em injeções diferentes.

- 11.14.3. Determine o número de poços necessário para uma corrida.
  - Número de poços = 24X
    - X = o número de injeções.
  - Calcule o volume necessário de solução de padrões de tamanho.
    - Volume máximo de solução de padrões de tamanho = 9,5 µL × (24X + 4)
    - As quatro (4) amostras adicionais são adicionadas a X para ter em consideração erros de pipetagem.
- 11.14.4. Adicione 9,5 µL de solução de padrões de tamanho aos poços da placa de EC que contêm amostras. Adicione 9,5 µL de solução de padrões de tamanho ou apenas formamida Hi-Di a eventuais poços restantes que serão injetados (múltiplo de 24), mas que não contêm amostras.

**NOTA:** Todos os 24 poços de uma injeção têm de conter amostra misturada com solução de padrões de tamanho, apenas solução de padrões de tamanho ou apenas formamida Hi-Di.

- 11.14.5. A partir de cada poço da PCR (apenas ITD) ou poço da digestão (apenas TKD), transfira 0,5 µL do produto da PCR ou da digestão para o poço correspondente na placa de EC usando uma pipeta multicanal.

**NOTA:** Poderá ser usada uma pipeta de canal único para transferir produto da PCR/digestão durante a retestagem de poços individuais.

- 11.14.6. Vede a placa de EC com uma película vedante e centrifugue a placa a 1400 × g durante 1 minuto.
- 11.14.7. Coloque a placa de EC num termociclador Veriti Dx e feche a tampa.
- 11.14.8. Programe o termociclador com os passos listados abaixo (intensidade da rampa 75%).
  - Passo 1: 95 °C durante 3 minutos
  - Passo 2: 4 °C durante 5 minutos
- 11.14.9. Pressione **Run** (Correr) para continuar para o ecrã seguinte. Certifique-se de que a definição do volume da reação é de 10 µL, que a definição da temperatura da cobertura é de 105,0 °C e que a cobertura será aquecida durante a corrida. Pressione **Start Run Now** (Iniciar corrida agora) para começar a corrida.
- 11.14.10. Depois de a corrida terminar, confirme que não estão presentes quaisquer bolhas inspecionando visualmente as placas dos poços. Remova eventuais bolhas centrifugando a placa de EC a 1400 × g durante 1 minuto.
- 11.14.11. Prepare cada montagem de placa colocando a placa da EC numa base de placa de 96 poços do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx, confirmando que os cantos ranhurados ficam alinhados. Retire a película vedante e coloque novos septos de placa de 96 poços na placa, garantindo que os septos estão planos e que todas as aberturas dos mesmos estão desobstruídas. Encaixe um retentor de placas de 96 poços para o instrumento 3500xL ou 3500xL Dx.

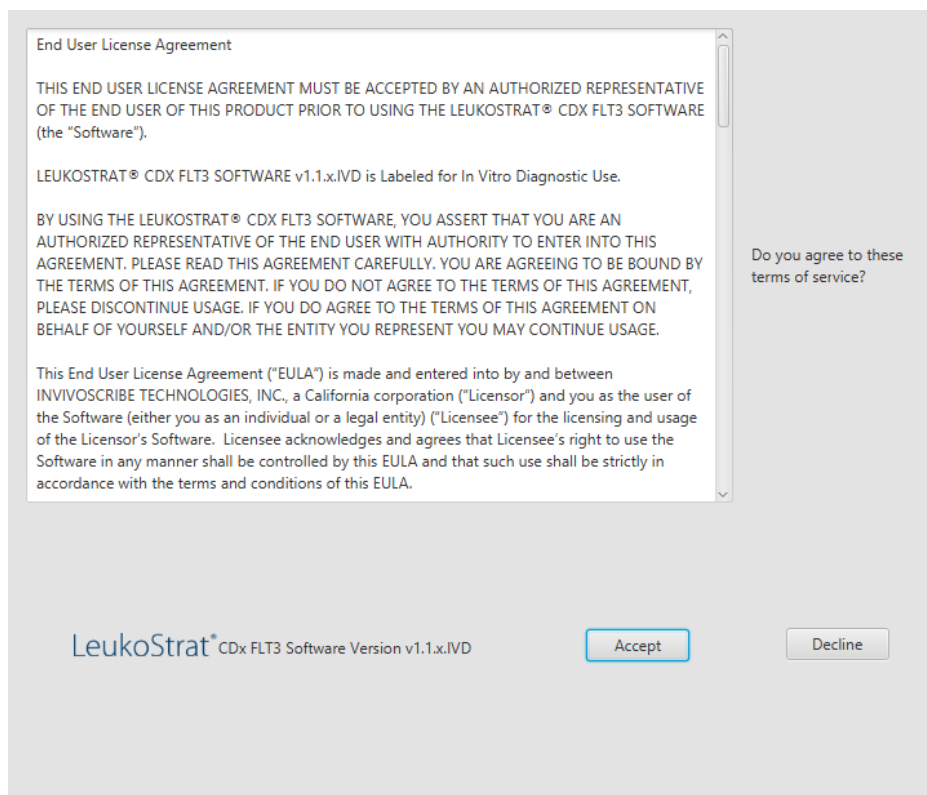
## 11.15. Configure o PlateMapper com o LeukoStrat CDx *FLT3* Software

**NOTA:** É necessária a permissão do Administrador para instalar o LeukoStrat® CDx *FLT3* Software.

### 11.15.1. Instale o LeukoStrat CDx *FLT3* Software.

- 11.15.1.1. Copie o instalador *LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi* do CD do software para um disco local no seu computador.
- 11.15.1.2. Faça duplo clique no ficheiro **LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi**.
  - 11.15.1.2.1. Se aparecer uma mensagem do *Microsoft Defender SmartScreen* depois de fazer duplo clique no ficheiro *msi*, clique em **More info** (Mais informação).
  - 11.15.1.2.2. Confirme que o editor é a Invivoscribe, Inc. Para prosseguir com a instalação, clique em **Run anyway** (Executar de qualquer modo).
- 11.15.1.3. Aparecerá a caixa do assistente de configuração do *LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi*. Clique em **Next** (Seguinte).
- 11.15.1.4. O local de instalação predefinido é *C:\Invivoscribe\LeukoStratCDx-1.1.x.IVD\*. Clique em **Next** (Seguinte).
- 11.15.1.5. Clique em **Install** (Instalar). A instalação será iniciada.
- 11.15.1.6. Aparecerá uma caixa de diálogo de *User Account Control* (Controlo de Conta de Utilizador). Clique em **Yes** (Sim).
- 11.15.1.7. Clique em **Finish** (Finalizar) para sair do assistente de configuração.

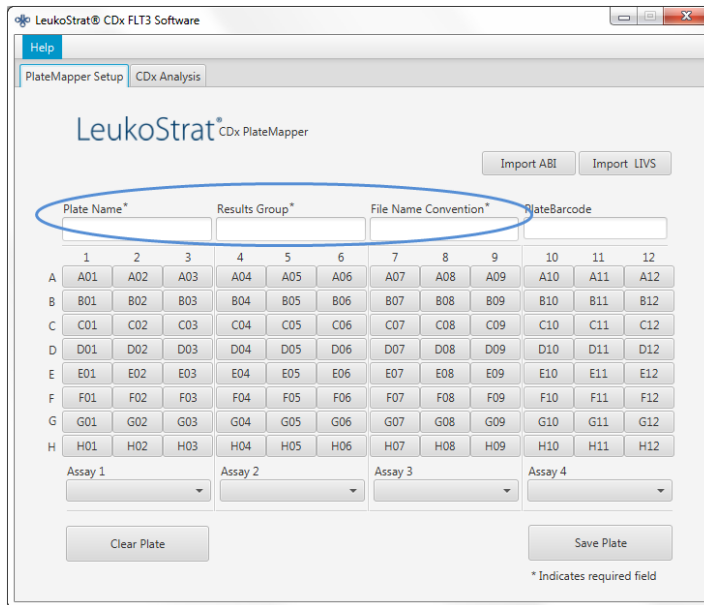
11.15.2. Abra o *LeukoStrat CDx FLT3 Software*. Clique em **Accept** (Aceitar ) para aceitar os termos do serviço.



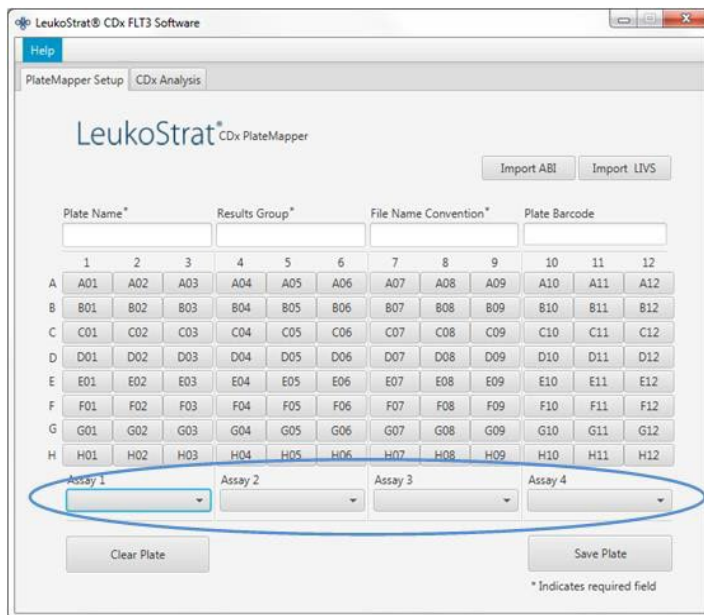
11.15.3. No separador *PlateMapper Setup* (Configuração do PlateMapper), preencha os três campos necessários localizados acima do mapa da placa. Estes campos necessários são *Plate Name* (Nome da placa), *Results Group* (Grupo de resultados) e *File Name Convention* (Convenção do nome de ficheiros) (assinalados abaixo).

11.15.3.1. Os nomes dos mapas de placas apenas poderão conter 50 caracteres ou menos e ser constituídos por [A-Z, a-z, 0-9], espaços simples e hífenos.

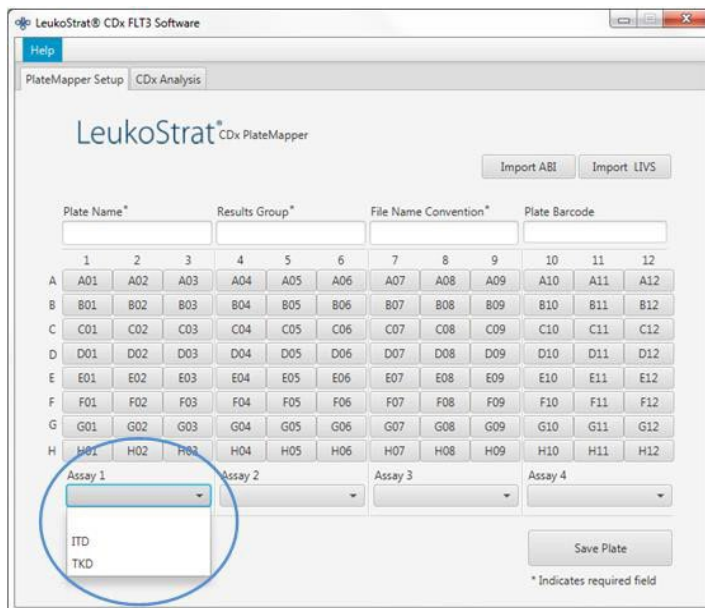
11.15.3.2. As entradas *Results Group* (Grupo de resultados) e *File Name Convention* (Convenção do nome de ficheiros) têm de corresponder aos nomes das entradas correspondentes programadas pelo utilizador no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx (seleccionadas no passo 11.16.14).



11.15.4. O mapa da placa tem quatro ensaios permitidos por placa (três colunas por ensaio). Cada ensaio corresponde à injeção que ocorrerá durante a corrida do instrumento 3500xL ou 3500xL. Apenas poderá ser corrido um ensaio por injeção (ITD ou TKD).



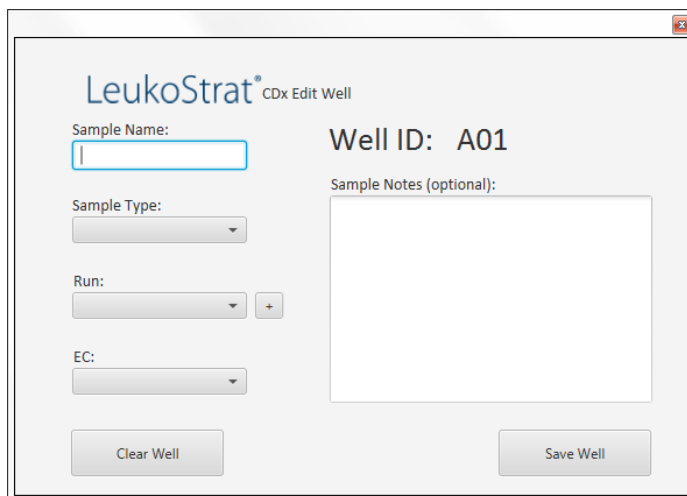
11.15.5. Seleccione o ensaio a partir do menu pendente (  Ensaio 1) que corresponde às amostras que estão localizadas sobre o mesmo no ecrã *PlateMapper Setup* (Configuração do PlateMapper).



11.15.6. No mapa da placa, introduza a informação para cada poço que terá uma amostra ou controlo a ser analisado.

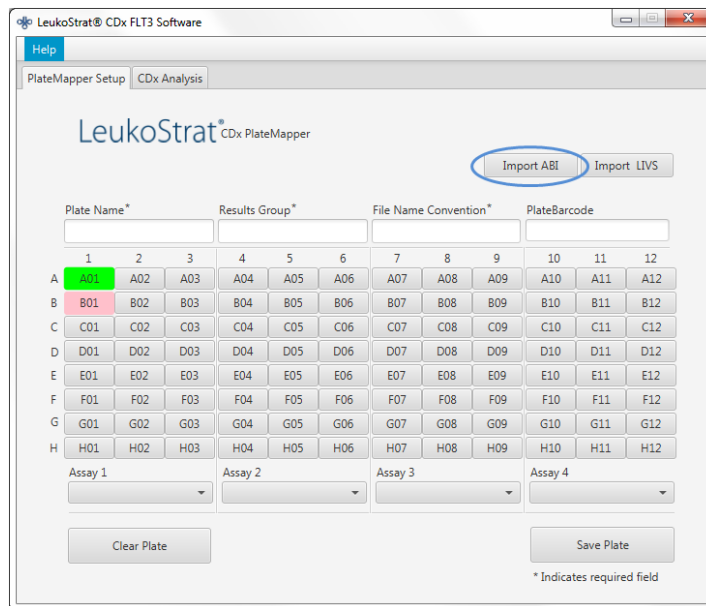
**NOTA:** Ao introduzir a informação dos poços, introduza primeiro o *Extraction Control (EC) (Controlo da extração (CE))*, o *Positive Control (PC) (Controlo Positivo (CP))* e o *No Template Control (NTC) (Controlo sem molde (CSM))*. Os controlos poderão ser colocados em qualquer sítio da placa, não necessariamente nos três primeiros poços. Introduza a informação para os poços das AMOSTRAS de seguida, pois será necessário associá-las ao respetivo controlo da extração. Os controlos positivos e os controlos sem molde não estão associados a controlos de extração.

11.15.6.1. Para introduzir informação, clique no respetivo poço (p. ex., A01) e será apresentada a seguinte caixa:



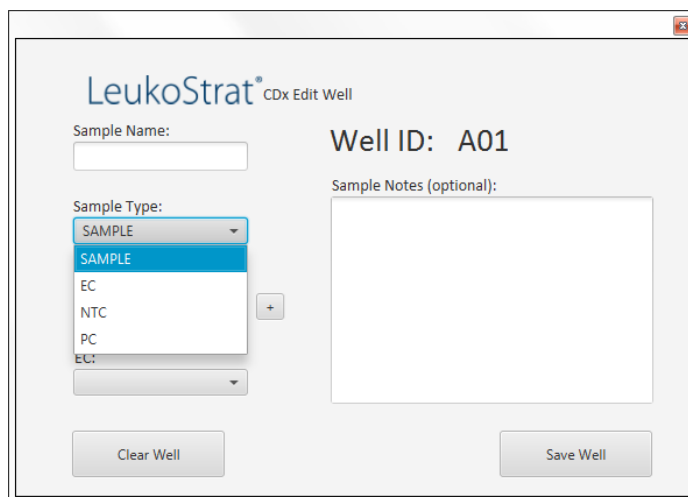
11.15.7. Introduza um *Sample Name* (Nome da amostra) que descreva o poço. Os nomes das amostras apenas poderão conter 50 caracteres ou menos e ser constituídos por [A-Z, a-z, 0-9], espaços simples e hífenes.

11.15.7.1. O utilizador poderá também importar nomes de amostras para o mapa da placa usando o *3500 Plate Layout File* versão 1.0 da Thermo Fisher Scientific. Introduza nomes das amostras no *3500 Plate Layout File* e importe com o botão **Import ABI** (Importar ABI).



11.15.8. Selecione o **Sample Type** (Tipo de amostra) para cada poço a partir do menu pendente. As opções a selecionar são:

- SAMPLE (AMOSTRA) = desconhecida
- EC (CE) = Controlo da extração
- NTC (CSM) = Controlo sem molde
- PC (CP) = Controlo positivo



- 11.15.9. Selecione o **Run Number** (Número da corrida) a partir do menu pendente. Para adicionar um novo número da corrida, clique no sinal “+” ao lado do menu pendente.

**NOTA:** Uma “corrida” é definida por todas as amostras, uma análise do controlo positivo, todos os controlos de extração associados às amostras em teste e uma análise do controlo sem molde. As corridas poderão incluir várias injeções e várias corridas poderão ser testadas numa placa.

- 11.15.9.1. Selecione o **EC** (CE) associado a partir do menu pendente (apenas necessário se o *Sample Type* (Tipo de amostra) for *SAMPLE* (AMOSTRA)). Poderão estar associadas a um único controlo da extração até 11 amostras.

- 11.15.10. Poderão ser introduzidos comentários adicionais sobre a amostra ou controlo no campo *Sample Notes* (Notas da amostra). Estes comentários aparecerão no *Sample Report* (Relatório da amostra).



- 11.15.11. Quando tiverem sido introduzidas todas as informações referentes ao poço, clique em **Save Well** (Guardar poço) para guardar. Para limpar o conteúdo do poço, clique em **Clear Well** (Limpar poço).

- 11.15.12. Quando o poço tiver sido guardado, a cor apresentada mudará para esse poço. O poço será mostrado a vermelho até ter sido configurado corretamente, momento em que mudará para verde (conforme mostrado abaixo).

**NOTE:** Se estiver correto, a cor do controlo da extração não mudará para verde até o cursor passar por cima desse poço.

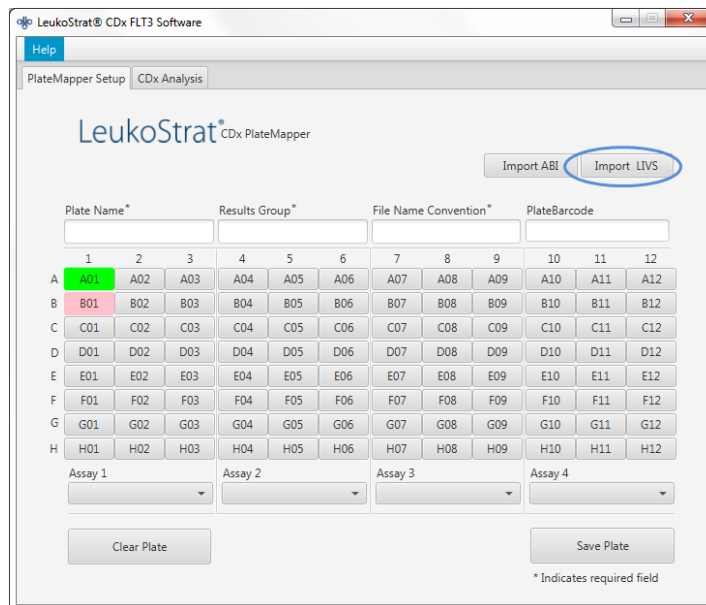
- 11.15.13. Continue a introduzir cada poço no ecrã *PlateMapper Setup* (Configuração do PlateMapper) até todos os poços com informações de amostras estarem destacados a verde.
- 11.15.14. Quando todos os poços tiverem sido introduzidos, clique em **Save Plate** (Guardar placa) e será pedida ao utilizador uma localização para guardar o ficheiro ABI (3500 Plate Layout File versão 1.0) e o ficheiro LIVS gerados pelo software. Um ficheiro ABI e um ficheiro LIVS serão gerados para cada configuração de placa.

**NOTA:** Não modifique o ficheiro ABI gerado pelo LeukoStrat CDx *FLT3* Software. Isso poderia resultar num erro aquando do carregamento no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx.

**NOTA:** Se o LeukoStrat CDx *FLT3* Software não for fechado assim que um mapa de placa for gerado, as ID de corrida automaticamente atribuídas nos ficheiros gerados não serão únicas e repetir-se-ão em várias corridas.

11.15.14.1. O utilizador poderá rever o ficheiro LIVS criado clicando em **Import LIVS** (Importar LIVS) e navegando até à localização onde o ficheiro foi guardado.

**NOTA:** A função **Import LIVS** (Importar LIVS) destina-se apenas a rever a configuração da placa. O ficheiro LIVS não pode ser modificado para criar um novo mapa de placa para utilização noutra corrida. Isso resultará num erro.



11.15.15. O utilizador continuará com o software depois de a corrida no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx ter concluído.

11.15.16. Use o ficheiro ABI gerado pelo LeukoStrat CDx FLT3 Software para carregar a placa no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx.

11.15.17. Se ocorrer uma falha ao guardar a placa, siga as recomendações na Tabela 8. Se for necessária assistência adicional, queira por favor entrar em contacto com o Apoio Técnico da Invivoscribe através do endereço de correio eletrónico [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com).

Tabela 8: Mensagens de erro ao guardar a placa e ações corretivas

Mensagem de erro ao guardar a placa [código]	Potenciais causas	Ações corretivas
<ul style="list-style-type: none"> <li>Corrupted sample detected. (Amostra corrompida detetada.) [PM01]</li> <li>Could not detect well for object UUID. (Não foi possível detetar poço para objeto UUID.) [PM02]</li> <li>Control detected unknown links for well (A-H, 01- 12). (Controlo detetou ligações desconhecidas para poço (A-H, 01-12).) [PM3]</li> </ul>	Tentativa de carregar um ficheiro LIVS modificado.	Não modifique o ficheiro LIVS. Se o ficheiro estiver corrompido, tem de ser criado um novo ficheiro LIVS.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Missing required field "Plate Name". (Campo "Nome da placa" necessário em falta.) [PM04]</li> <li>Illegal character detected in "Plate Name". (Carácter não permitido detetado em "Nome da placa".) [PM05]</li> <li>Multiple spaces detected in "Plate Name". (Espaços múltiplos detetados em "Nome da placa".) [PM06]</li> <li>Plate Name must be 50 characters or less. (O nome da placa tem de ter 50 caracteres ou menos.) [PM28]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções de utilização relativamente à nomenclatura de uma placa.	O nome de um mapa de placa apenas poderá conter 50 caracteres ou menos e ser constituído por [A-Z, a-z, 0-9], espaços simples e hífenes.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Missing required field "Result Group". (Campo "Grupo de resultados" necessário em falta.) [PM07]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções de utilização relativamente à nomenclatura de um <i>Result Group</i> (Grupo de resultados).	O <i>Result Group</i> (Grupo de resultados) é definido no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Missing required field "File Naming Convention". (Campo "Convenção de nomenclatura de ficheiros" necessário em falta.) [PM08]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções de utilização relativamente à nomenclatura de uma <i>File Naming Convention</i> (Convenção de nomenclatura de ficheiros).	A <i>File Naming Convention</i> (Convenção de nomenclatura de ficheiros) é definida no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Assay not selected for all samples. (Ensaio não selecionado para todas as amostras.) [PM09]</li> <li>Run contains more than 1 Assay type. (A corrida contém mais de 1 tipo de ensaio.) [PM10]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções de utilização relativamente à atribuição do tipo de ensaio.	Todos os poços têm de ter a atribuição de um tipo de ensaio e uma corrida não poderá conter mais de um tipo de ensaio.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Sample name not detected for well (A-H, 01-12). (Nome da amostra não detetado para o poço (A-H, 01-12).) [PM11]</li> <li>Illegal character detected in Sample Name. (Carácter não permitido detetado no nome da amostra.) [PM12]</li> <li>Multiple spaces detected in Sample Name. (Espaços múltiplos detetados no nome de amostra.) [PM13]</li> <li>Sample name must be 50 characters or less. (O nome da amostra tem de ter 50 caracteres ou menos.) [PM14]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções de utilização relativamente à nomenclatura de uma amostra.	O nome de uma amostra apenas poderá conter 50 caracteres ou menos e ser constituído por [A-Z, a-z, 0-9], espaços simples e hífenes.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Sample Type not selected for well (A-H, 01-12). (Tipo de amostra não selecionado para o poço (A-H, 01-12).) [PM15]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções de utilização relativamente à seleção de um tipo de amostra.	Todos os poços têm de ter a atribuição de um tipo de amostra. As escolhas são <i>PC</i> (CP), <i>NTC</i> (CSM), <i>EC</i> (CE) e <i>SAMPLE</i> (AMOSTRA).
<ul style="list-style-type: none"> <li>Run not selected for well (A-H, 01-12). (Corrida não selecionada para o poço (A-H, 01-12).) [PM16]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções	Todos os poços têm de ter a atribuição de uma corrida. O primeiro poço com atribuição

**Tabela 8:** Mensagens de erro ao guardar a placa e ações corretivas

Mensagem de erro ao guardar a placa [código]	Potenciais causas	Ações corretivas
<ul style="list-style-type: none"> <li>No Runs created for Plate. (Não foram criadas corridas para a placa.) [PM17]</li> </ul>	de utilização relativamente à seleção de corridas.	de uma corrida requer que o utilizador incremente o número da corrida (botão "+" ao lado da seleção da <i>Run</i> (Corrida)). Os poços subsequentes podem incrementar o número da corrida ou selecionar um número de corrida usado anteriormente.
<ul style="list-style-type: none"> <li>EC not selected for well (A-H, 01-12). (CE não selecionado para o poço (A-H, 01-12).) [PM18]</li> <li>Sample attached to unknown EC for well (A-H, 01- 12). (Amostra associada a CE desconhecido para o poço (A-H, 01- 12).) [PM19]</li> <li>EC selected on control for well (A-H, 01-12). (CE selecionado no controlo para o poço (A-H, 01-12).) [PM20]</li> <li>No samples linked to EC for well (A-H, 01-12). (Sem amostras associadas a CE para o poço (A-H, 01-12).) [PM21]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções de utilização relativamente à atribuição de CE. Tentativa de carregar um ficheiro LIMS modificado.	Todos os poços <i>SAMPLE</i> (AMOSTRA) têm de estar atribuídos a um CE. Não atribua um poço de controlo a um CE. Cada CE tem de estar associado a pelo menos uma amostra.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Run missing PC, NTC, EC. (Corrida sem CP, CSM, CE.) [PM22]</li> <li>Run detected control in sample list. (A corrida detetou controlo na lista de amostras.) [PM23]</li> <li>Run missing samples. (Amostras em falta na corrida.) [PM24]</li> <li>Run contains more than one (1) assay type. (A corrida contém mais de um (1) tipo de ensaio.) [PM25]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções de utilização relativamente à atribuição de corridas. Tentativa de carregar um ficheiro LIMS modificado.	Cada corrida tem de conter um controlo de cada tipo (CP, CSM, CE). Uma corrida tem de conter pelo menos um poço do tipo <i>SAMPLE</i> (AMOSTRA). Uma corrida tem de conter exatamente um tipo de ensaio.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Too many samples linked to EC for well (A-H, 01-12). (Demasiadas amostras associadas a CE para o poço (A-H, 01-12).) [PM26]</li> <li>EC linked to more than one run for well (A-H, 01- 12). (CE associado a mais de uma corrida para o poço (A-H, 01- 12).) [PM27]</li> </ul>	Não seguimento das orientações das instruções de utilização relativamente à atribuição de CE.	Um único CE não poderá estar associado a mais de 11 amostras. Um único CE não poderá estar associado a amostras em mais de uma corrida.

### 11.16. Configurar o software do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx

**NOTA:** O LeukoStrat CDx *FLT3* Software cria um ficheiro para importação no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx (ficheiro ABI) que anexa informação ao nome da amostra. O software do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx poderá anexar informação adicional.

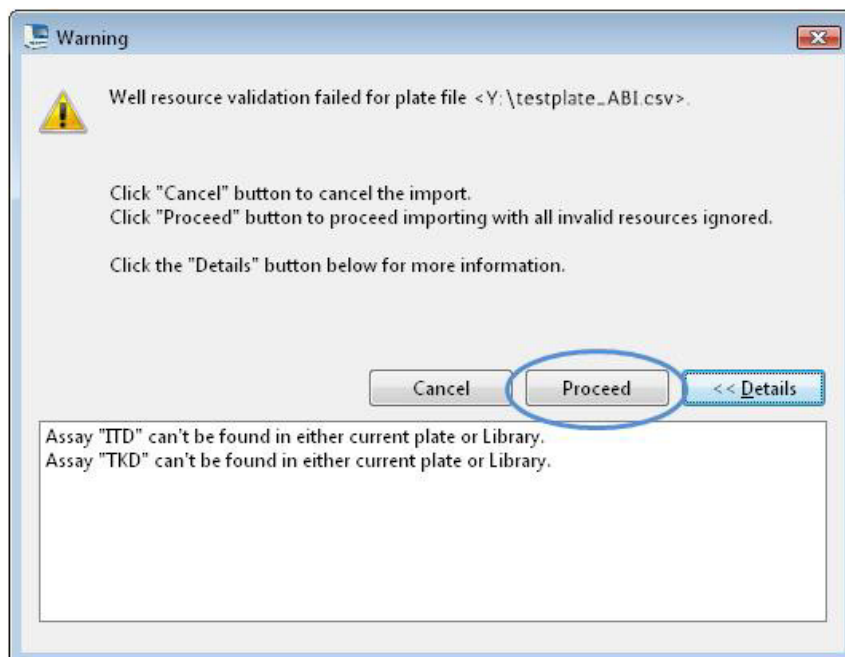
11.16.1. Todos os passos dos instrumentos 3500xL e 3500xL Dx, incluindo os procedimentos de instalação, funcionamento, calibração, limpeza e manutenção, são executados de acordo com as instruções do fabricante, salvo indicação em contrário a seguir.

11.16.2. Se o Data Collection Software (Software de recolha de dados) ainda não possuir definições para o ensaio ITD CDx e o ensaio TKD CDx, importe os ficheiros fornecidos no CD do software incluído para o ABI 3500xL ou para o modo IVD do software do ABI3500xL Dx de acordo com o manual do utilizador do instrumento.

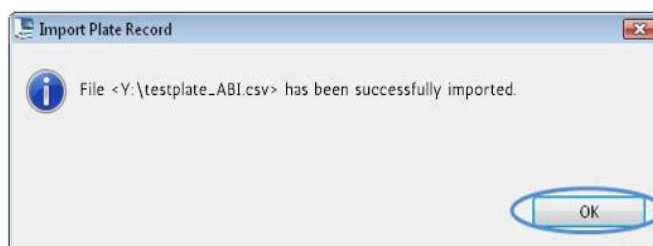
**NOTA:** No disco de software fornecido, há duas pastas que contêm ficheiros .xml: 3500xL RUO Files e 3500xL Dx Files; selecione os ficheiros apropriados para importação dependendo do instrumento que está a ser usado. A tentativa de importar os ficheiros errados para qualquer dos instrumentos poderá resultar num erro.

**NOTA:** Ter um ensaio, uma convenção de nomenclatura de ficheiros ou um grupo de resultados com o mesmo nome no modo RUO e no modo IVD do Data Collection Software (Software de recolha de dados) do instrumento 3500xL Dx poderá resultar num erro. Certifique-se de que não existem, no modo RUO do DCS do instrumento 3500xL Dx, nomes que correspondam aos nomes do ficheiro XML fornecido.

- 11.16.3. A partir do ecrã do painel de controlo do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx, clique no botão **Create New Plate** (Criar nova placa).
- 11.16.4. Para o *Plate Name* (Nome da placa), introduza um descritor curto.
- 11.16.5. Certifique-se de que o número de poços está definido para 96.
- 11.16.6. Para o tipo de placa, selecione **Fragment** (Fragmento) a partir do menu pendente.
- 11.16.7. Certifique-se de que o comprimento dos capilares é de 50 cm e que o polímero é POP7.
- 11.16.8. Introduza as iniciais do operador na secção *Owner* (Titular).
- 11.16.9. Clique em Assign Plate Contents (Atribuir conteúdos da placa).
- 11.16.10. Clique no botão **Import** (Importar) no topo do ecrã e aparecerá uma janela pop-up. Navegue até ao *ficheiro para importação no instrumento 3500xL (Dx)* (o ficheiro ABI) criado pelo LeukoStrat CDx *FLT3* Software. Clique em **OPEN** (ABRIR) na janela pop-up e clique em **OK** na janela pop-up de confirmação da importação.
- 11.16.10.1. Se não houver correspondência na biblioteca do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx para o nome do ensaio no ficheiro ABI, clique em **Proceed** (Continuar) na janela pop-up que aparece:



- 11.16.11. Clique em **OK** na janela pop-up seguinte.



- 11.16.12. Quando a importação estiver concluída, as ID das amostras serão preenchidas automaticamente no esquema da placa no ecrã. Verifique que o esquema da placa no ecrã está correto analisando as ID das amostras no ecrã. Se as amostras não corresponderem à configuração pretendida, um novo ficheiro ABI tem de ser criado no LeukoStrat CDx *FLT3* Software e importado de novo no instrumento ABI 3500xL ou 3500xL Dx.

**NOTA:** Não mude as ID das amostras no mapa da placa do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx. Isso resultará num erro.

- 11.16.13. Confirme que os *Assays* (Ensaios) programados no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx usam os parâmetros listados na Tabela 6 para o **ensaio ITD CDx** ou **ensaio TKD CDx**.
- 11.16.14. Atribua o *Assay* (*Ensaio*), o *Results Group* (Grupo de resultados) e a *File Name Convention* (Convenção de nomenclatura de ficheiros) a todos os poços que contenham amostras e controlos, se necessário.

**NOTA:** A *File Name Convention* (Convenção de nomenclatura de ficheiros) tem de incluir o *Sample Name* (Nome da amostra) como primeiro atributo.

- 11.16.15. Carregue a(s) placa(s) no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx.
- 11.16.16. Clique em **Link Plate for Run** (Associar placa a corrida). O operador poderá guardar alterações à placa, se tal lhe for proposto. Caso se pretenda correr uma segunda placa, repita os passos 11.16.2 a 11.16.15.

### 11.17. Realizar corridas no analisador genético 3500xL ou 3500xL Dx

- 11.17.1. Verifique a tubagem de POP-7 quanto à presença de bolhas. Remova as bolhas, se necessário.
- 11.17.2. Clique em **Start Run** (Iniciar corrida) para dar início à corrida no instrumento 3500xL ou 3500xL Dx.
- 11.17.3. Depois da conclusão da corrida, remova e descarte os septos e descarte a placa de EC.

**NOTA:** Em caso de erro de conectividade entre o instrumento 3500xL ou 3500xL Dx e o computador que executa o Data Collection Software (Software de recolha de dados), siga as instruções de resolução de problemas do fabricante do instrumento.

- 11.17.4. O GeneMapper poderá ser usado para analisar ficheiros; continue na secção *Análise de dados com o software GeneMapper* (11.18). O Data Collection Software (Software de recolha de dados) poderá ser usado como alternativa para analisar ficheiros; continue na secção *Análise de dados com o Data Collection Software* (Software de recolha de dados) (11.19).

### 11.18. Análise de dados com o software GeneMapper

**NOTA:** Não ignore um erro de padrões de tamanho para um poço no software GeneMapper.

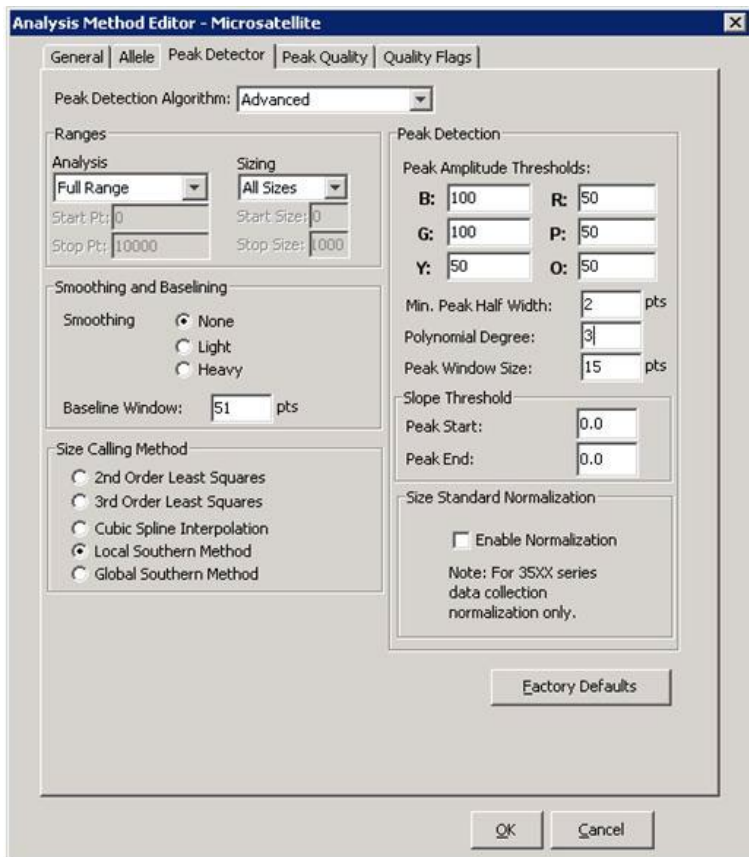
- 11.18.1. Abra o software *GeneMapper v6.x*.
- 11.18.2. No menu *File* (Ficheiro), escolha **New Project** (Novo projeto) e selecione **Microsatellite** (Microsatélite). Clique em **OK**. Regresse ao Menu *File* (Ficheiro) e escolha **Add Samples to Project** (Adicionar amostras ao projeto).
- 11.18.3. No painel esquerdo, navegue até aos ficheiros de dados na pasta de dados do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx (designados pelo *Results Group* (Grupo de resultados)) e clique em **Add to List** (Adicionar à lista) para transferi-los para o painel direito. Clique no botão **Add** (Adicionar) ou **Add & Analyze** (Adicionar e analisar).
- 11.18.4. Assegure-se de que o *Analysis Method* (Método de análise) está definido para um método **Microsatellite** (Microsatélite) e que o *Size Standard* (Padrões de tamanho) está definido para **GS600LIZ+Normalization** (GS600LIZ+Normalização) para todas as amostras.

**NOTA:** Se houver vários tipos de ensaio numa placa, as opções *Analysis Method* (Método de análise) e *Size Standard* (Padrões de tamanho) podem ser definidas por injeção para facilitar o fluxo de trabalho. *Injeções* (Injeções) pode ser selecionado na janela *Project* (Projeto).

- 11.18.5. Certifique-se de que as definições do método de análise estão corretamente configuradas. Consulte a Figura 3.
  - 11.18.5.1. Clique em **Analysis** (Análise) e depois em **Analysis Method Editor** (Editor do método de análise) a partir do menu no topo do ecrã.
  - 11.18.5.2. No separador *Peak Detector* (Detetor de picos), certifique-se de que o *Peak Detection Algorithm* (Algoritmo de deteção de picos) está definido para **Advanced** (Avançado).
  - 11.18.5.3. Certifique-se de que, nos *Peak Amplitude Thresholds* (Limites de amplitude de picos), está introduzido **100** para **B** (blue (azul)) e **G** (green (verde)) e **50** para os restantes, nomeadamente **Y** (yellow (amarelo)), **R** (red (vermelho)), **P** (purple (roxo)) e **O** (orange (laranja)). Os canais dos corantes amarelo e roxo não são usados no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
  - 11.18.5.4. Certifique-se de que o *Polynomial Degree* (Grau polinomial) está definido para **3** no caso de ITD e **5** no caso de TKD.
  - 11.18.5.5. Clique em **OK** no fundo da janela.



**NOTA:** Poderão ser configurados e usados no GeneMapper métodos de análise específicos para ITD e TKD indo a *Tools* (Ferramentas) e selecionando o **GeneMapper Manager** (Gestor do GeneMapper). A partir do separador *Analysis Methods* (Métodos de análise), clique no botão **New...** (Novo...) e selecione **Microsatellite** (Microsatélite) como tipo de análise. Clique em **OK**. Forneça um *Name* (Nome), uma *Description* (Descrição) e um *Instrument* (Instrumento) no separador *General* (Geral), defina o separador *Peak Detector* (Detetor de picos) conforme descrito acima e na Figura 3 e deixe os separadores *Allele* (Alelo), *Peak Quality* (Qualidade dos picos) e *Quality Flags* (Sinalizadores de qualidade) definidos para as definições *Microsatellite* (Microsatélite) predefinidas. Selecione **Done** (Concluído) e o novo método de análise fica selecionável.

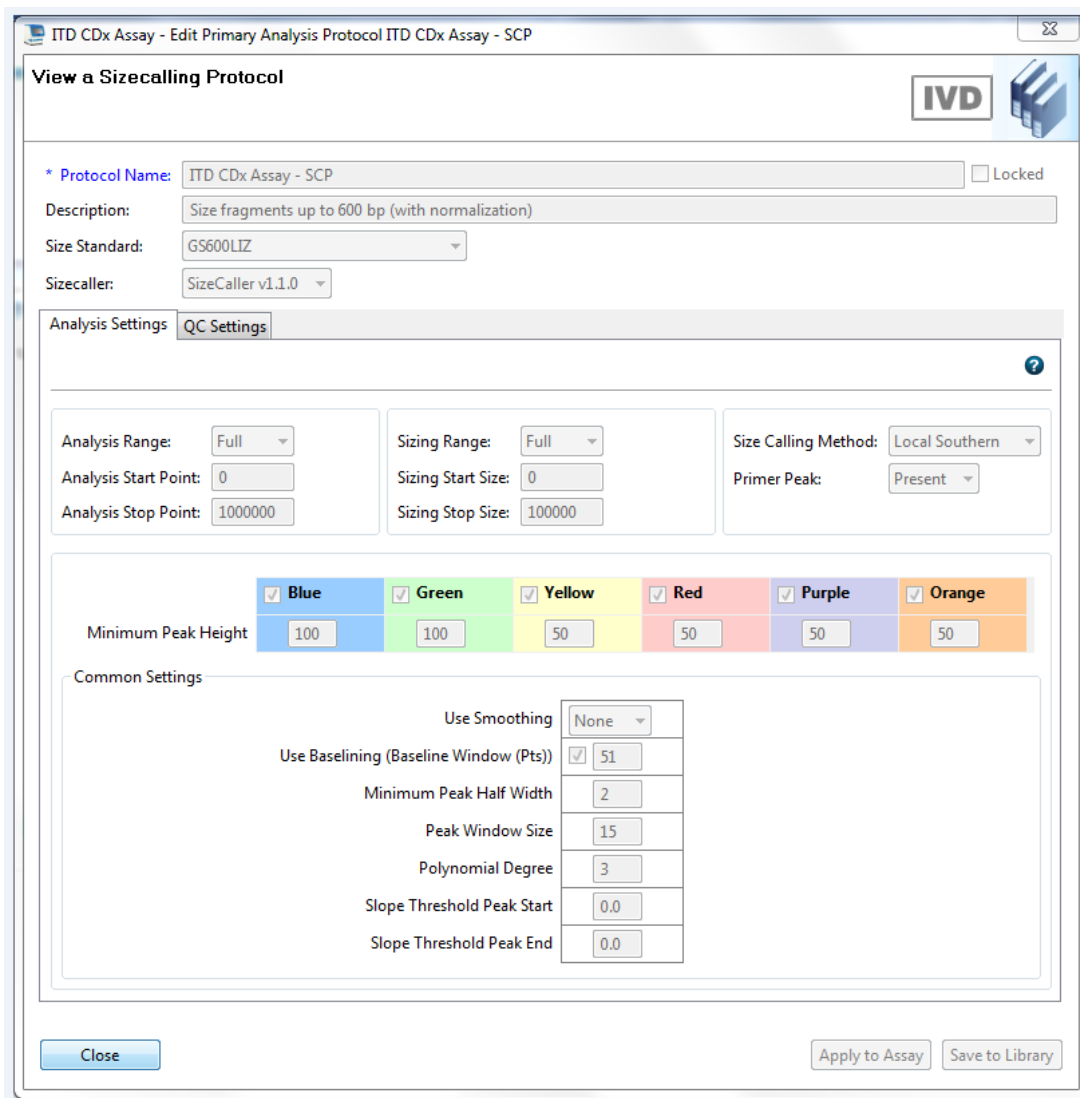


**Figura 3.** Definições do método de análise para ITD. Para TKD, as definições são idênticas exceto que o *Polynomial Degree* (Grau polinomial) é definido para 5.

- 11.18.6. Clique no **botão de reprodução verde** para começar a análise. Guarde o projeto do GeneMapper com um nome apropriado.
- 11.18.7. No software GeneMapper, destaque as amostras e os controlos e clique no botão **Display Plots** (Apresentar gráficos).
  - 11.18.7.1. Para ITD, certifique-se de que o ícone **Sizing Table** (Tabela de dimensionamento) está selecionado e que os corantes azul, verde e vermelho estão selecionados na janela **Samples Plot** (Gráfico das amostras).
  - 11.18.7.2. Para TKD, certifique-se de que o ícone **Sizing Table** (Tabela de dimensionamento) está selecionado e que os corantes azul e vermelho estão selecionados.
- 11.18.8. Certifique-se de que a tabela abaixo do eletroferograma contém as seguintes colunas: **Dye/Sample Peak** (Pico do corante/amostra), **Sample File Name** (Nome do ficheiro da amostra), **Size** (Tamanho), **Height** (Altura) e **Area** (Área).
  - 11.18.8.1. Caso contrário, selecione **Tools** (Ferramentas) e depois **Plot Settings...** (Definições de gráficos...) a partir do menu **Samples Plot** (Gráfico das amostras).
  - 11.18.8.2. Selecione o separador **Sizing Table** (Tabela de dimensionamento) e certifique-se de que os itens que se seguem têm um visto verde na coluna **Show** (Mostrar): **Dye/Sample Peak** (Pico do corante/amostra), **Sample File Name** (Nome do ficheiro da amostra), **Size** (Tamanho), **Height** (Altura) e **Area** (Área).
  - 11.18.8.3. Clique em **OK**.
- 11.18.9. Para exportar as informações da tabela de dimensionamento, selecione **File** (Ficheiro) e depois **Export Table** (Exportar tabela) a partir do menu **Samples Plot** (Gráfico das amostras).
  - 11.18.9.1. Introduza um nome de ficheiro a selecione a localização para guardar o ficheiro.
  - 11.18.9.2. No menu pendente *Export File As* (Exportar ficheiro como), selecione **Comma-separated values (.csv)** (Valores separados por vírgulas (.csv)).
  - 11.18.9.3. Clique em **Export** (Exportar).

**NOTA:** Não edite o ficheiro CSV de nenhum modo.

11.19. Análise de dados com o Data Collection Software (Software de recolha de dados)



**Figura 4:** Definições do Sizecalling Protocol (Protocolo de determinação de tamanhos) para ITD conforme apresentadas num instrumento 3500 Dx. Para TKD, as definições são idênticas exceto que o *Polynomial Degree* (Grau polinomial) é definido para 5.

- 11.19.1. No DCS, no separador *Workflow* (Fluxo de trabalho), clique em **View Fragment/HID Results** (Ver resultados de fragmentos/HID).
- 11.19.2. Certifique-se de que as amostras que se pretende analisar estão selecionadas na janela superior. Poderão ser adicionadas amostras selecionando **Import** (Importar) e navegando até aos ficheiros FSA para a corrida. **Todas as amostras que apresentarem uma falha (X) na coluna *Sizing Quality* (Qualidade do dimensionamento) têm de ser desmarcadas antes de exportar.**

Sample File Name	Sample Name	Sample Type	Size Standard	PA Protocol	SA Protocol	Run Name	Instrument Type	Instrument ID	Injection Start Date	Sizing Quality	Offscale	Normalized Sample	User Di	User Di	User Di	User Di	Capillary ID	Plate No
1 IEC2-Run8A_ITD_EC_C01_RID...	ITDIEC2-Run8...	Sample	GS600LIZ	ITD CDx Assay ...		I:\NVS FLT3-IV...	ABI3500	29851-010	23-Jul-2019 03...	✓	NO						7	Run 8A
2 INTC-Run8A_ITD_INTC_D01_RL...	ITDINTC-Run8...	Sample	GS600LIZ	ITD CDx Assay ...		I:\NVS FLT3-IV...	ABI3500	29851-010	23-Jul-2019 03...	✓	NO						10	Run 8A
3 IPC-Run8A_ITD_IPC_B01_RID0...	ITDIPC-Run8A...	Sample	GS600LIZ	ITD CDx Assay ...		I:\NVS FLT3-IV...	ABI3500	29851-010	23-Jul-2019 03...	✓	NO						4	Run 8A
4 PM6-Run8A-R1_ITD_SAMPLE...	ITDPM6-Run8...	Sample	GS600LIZ	ITD CDx Assay ...		I:\NVS FLT3-IV...	ABI3500	29851-010	23-Jul-2019 03...	✗	NO						1	Run 8A

**NOTA:** A não desmarcação das amostras com uma falha (X) na coluna *Sizing Quality* (Qualidade do dimensionamento) poderá resultar em resultados da amostra incorretos.

- 11.19.3. Certifique-se de que os corantes *Red* (Vermelho), *Green* (Verde) e *Blue* (Azul) estão marcados na janela *Plot View* (Vista de gráfico). Certifique-se de que os corantes *Orange* (Laranja) e *Yellow* (Amarelo) não estão marcados na janela *Plot View* (Vista de gráfico).
- 11.19.4. Use o menu pendente em *Sizing Table View* (Vista de tabela de dimensionamento) para seleccionar **Show Selected Dye Peaks** (Mostrar picos de corantes selecionados).



- 11.19.5. Certifique-se de que, na janela *Sizing Table View* (Vista de tabela de dimensionamento), as únicas colunas a aparecer são *Dye/Sample Peak* (Pico do corante/amostra), *Sample File Name* (Nome do ficheiro da amostra), *Size* (Tamanho), *Height* (Altura) e *Area in Point* (Área no ponto). Caso contrário, clique no botão no canto superior esquerdo da tabela de dimensionamento e remova ou adicione as colunas necessárias. Ajuste a ordem das colunas de forma a corresponder à ordem fornecida na Figura 5.

	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Size	Height	Area in Point
1	B, 1	Sample10_InstallFragmentPlate_B...		322	2616
2	B, 2	Sample10_InstallFragmentPlate_B...	9.09	24421	122843
3	B, 3	Sample10_InstallFragmentPlate_B...	10.52	726	4093
4	B, 4	Sample10_InstallFragmentPlate_B...	14.94	21260	107200

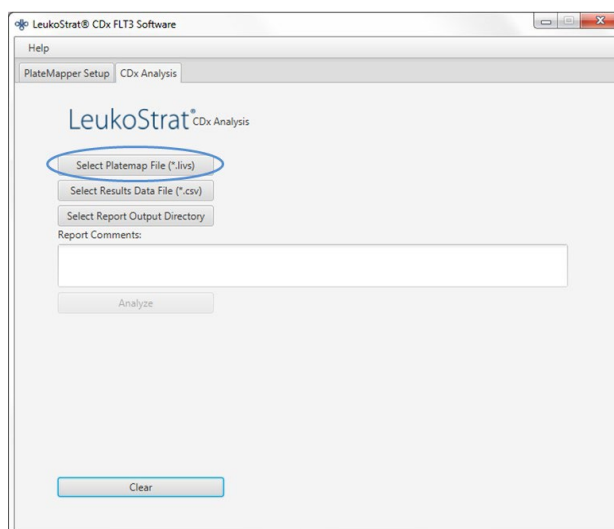
Figura 5. Exemplo de tabela de dimensionamento

- 11.19.6. Clique em **Export Results** (Exportar resultados) e guarde a exportação como ficheiro CSV.

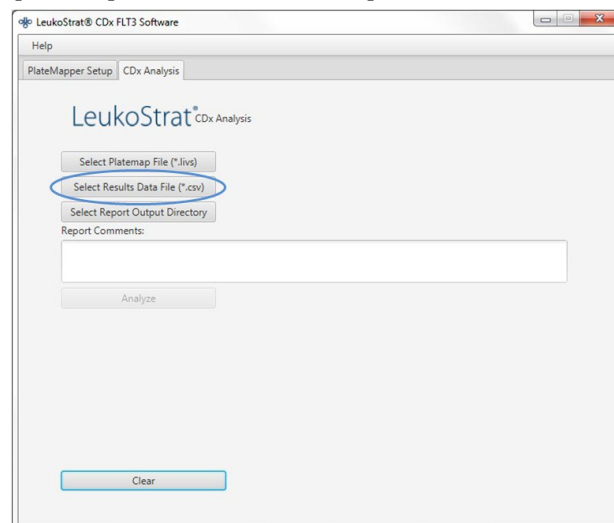
**NOTA:** Não edite o ficheiro CSV de nenhum modo.

## 11.20. Análise de dados com o LeukoStrat CDx *FLT3* Software

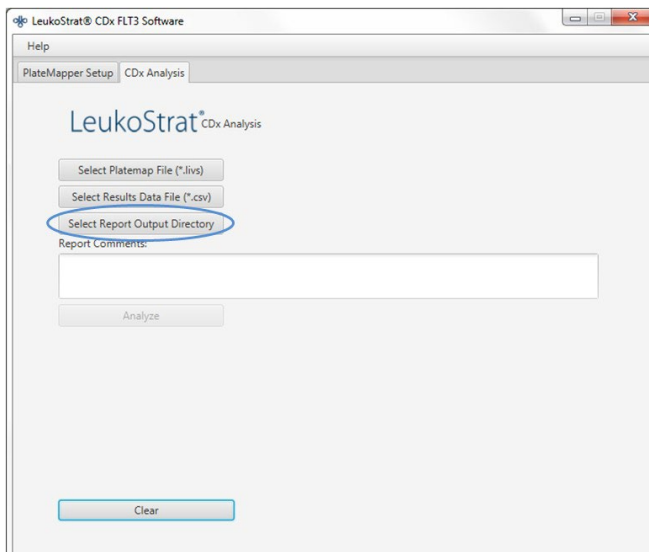
- 11.20.1. Abra o LeukoStrat CDx *FLT3* Software, aceite o acordo de licenciamento e clique no separador *CDx Analysis* (Análise de teste de diagnóstico complementar) do LeukoStrat CDx *FLT3* Software.
- 11.20.2. Clique em **Select Platemap File (\*.livs)** (Selecionar ficheiro de mapa de placa (\*.livs)) e navegue até ao ficheiro LIVS gerado a partir do separador *PlateMapper Setup* (Configuração do PlateMapper).



- 11.20.3. Clique em **Select Results Data File (\*.csv)** (Selecionar ficheiro de dados de resultados (\*.csv)) e selecione um ficheiro CSV exportado a partir do passo 11.18.9 ou 11.19.6 para análise.



- 11.20.4. Clique em **Select Results Output Directory** (Selecionar diretório de destino dos resultados) e escolha uma pasta de destino para os resultados.

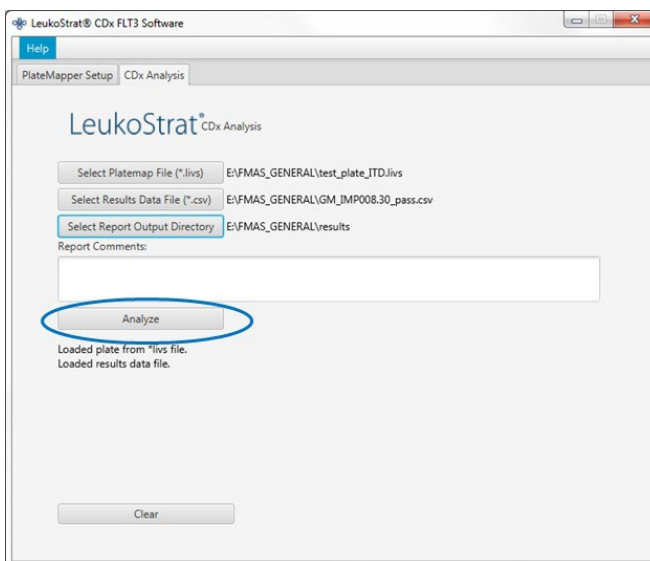


- 11.20.4.1. Podem ser introduzidos comentários adicionais sobre a corrida, as amostras ou os controlos no campo *Report Comments* (Comentários do relatório). Estes comentários aparecerão no *Run Report* (Relatório da corrida).

**NOTA:** Quando todos os ficheiros estiverem seleccionados, não crie nem importe um novo *Plate Map* (Mapa de placa) para o separador *PlateMapper Setup* (Configuração do PlateMapper) antes de analisar os dados/corrída atuais. As alterações no separador *PlateMapper Setup* (Configuração do PlateMapper) antes de seleccionar o botão **Analyze** (Analisar) farão com que o relatório apresente o *Plate Name* (Nome da placa) incorreto. Feche o LeukoStrat CDx FLT3 Software antes de mudar entre o separador *PlateMapper Setup* (Configuração do PlateMapper) e o separador *CDx Analysis* (Análise de teste de diagnóstico complementar).

- 11.20.5. Quando os três ficheiros estiverem seleccionados, o botão **Analyze** (Analisar) ficará seleccionável. Clique em **Analyze** (Analisar) e serão gerados três tipos de relatório na pasta de destino — um *PDF Run Report* (Relatório da corrida em PDF), *PDF Sample Report(s)* (Relatório(s) da(s) amostra(s) em PDF) e um *CSV run export file* (Ficheiro de exportação da corrida em CSV) (consulte a Figura 6, a Figura 7 e a Figura 8).

- O *Run Report* (Relatório da corrida) irá conter um resumo dos resultados para todos os controlos e amostras.
- O *Sample Report* (Relatório da amostra) irá conter resultados relativos aos controlos e detalhes relativos aos resultados da amostra.
- O *CSV run export file* (Ficheiro de exportação da corrida em CSV) irá conter todos os resultados da corrida num formato de folha de cálculo. As ID nos relatórios do LeukoStrat CDx FLT3 Software são os últimos 12 caracteres das ID geradas pelo 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 6. Exemplo de Run Report (Relatório da corrida).

# 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

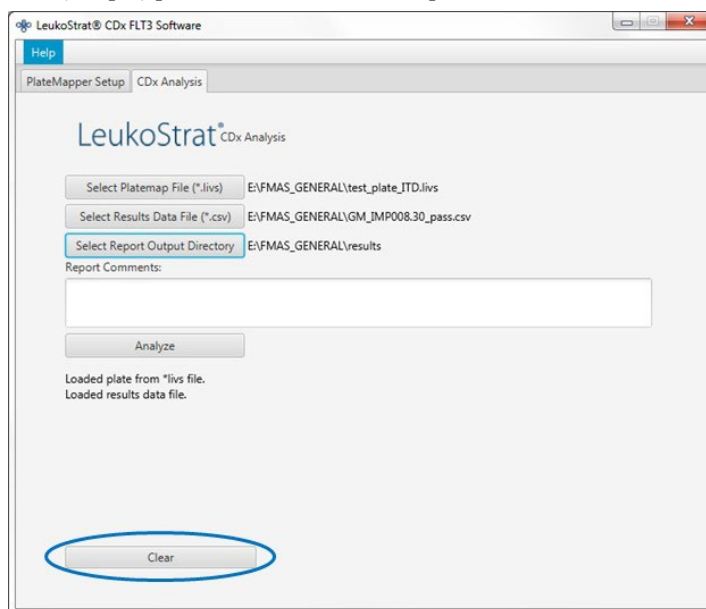
Report Comments
N/A

Figura 7. Exemplo de *Sample Report* (Relatório da amostra).

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		PCControl1_ITD_PC_H01	POS	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	323a17c2-c7bf-4d57-9c86-4a6bf004c2d2	NTC		NTCControl1_ITD_NTC_F01	UNSET	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	EC	08b5ee54-77a5-4159-a028-11f364c3-963	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	NEG	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	21c1a415-6fad-4f69-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	b19bcd10-092c-47e1-bed1-fc0e30ed3dcf	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA09_ITD_SAMPLE_A09	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	ac125670-78fe-42df-ab0e-1acae7f4a9c2	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA10_ITD_SAMPLE_A10	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	7a3b221f1-c898-424a-bb66-72c79c65c13	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA11_ITD_SAMPLE_A11	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD

Figura 8. Exemplo de *CSV run export file* (Ficheiro de exportação da corrida em CSV).

11.20.6. Clique em **Clear** (Limpar) para reiniciar todos os campos.



11.20.7. Se não forem obtidos resultados, verifique que todos os passos foram realizados corretamente. Consulte a Tabela 9 para resolver problemas de erros nos resultados de dados. Se for necessária assistência adicional, queira por favor entrar em contacto com o Apoio Técnico da Invivoscribe através do endereço de correio eletrónico [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com).



**Tabela 9:** Mensagens de erro nos resultados de dados e ações corretivas

Mensagem de erro ao carregar os resultados de dados	Potenciais causas	Ações corretivas
<ul style="list-style-type: none"> <li>Unrecognized dye: &lt;dye letter&gt; (Corante não reconhecido: &lt;letra do corante&gt;) [AD01]</li> </ul>	Seleção de corantes não usados durante o passo de análise no software GeneMapper ou no Data Collection Software (Software de recolha de dados).	Certifique-se de que estão selecionados apenas os corantes Red (Vermelho), Green (Verde) e Blue (Azul) durante o passo de análise no software GeneMapper ou no Data Collection Software (Software de recolha de dados).
<ul style="list-style-type: none"> <li>No red dye detected. Please make sure red dye is selected during previous signal analysis step. (Nenhum corante vermelho detetado. Certifique-se de que o corante vermelho é selecionado durante o passo de análise de sinal anterior.) [AD02]</li> </ul>	Não selecionou corante vermelho durante o passo de análise no software GeneMapper ou no Data Collection Software (Software de recolha de dados).	Certifique-se de que seleciona o corante vermelho durante o passo de análise no software GeneMapper ou no Data Collection Software (Software de recolha de dados).
<ul style="list-style-type: none"> <li>Unrecognized data results file format. (Formato de ficheiro de resultados de dados não reconhecido.) [AD03]</li> </ul>	O ficheiro do software GeneMapper ou do Data Collection Software (Software de recolha de dados) está corrompido.	Não edite o ficheiro do software GeneMapper ou do Data Collection Software (Software de recolha de dados) de nenhum modo.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Unable to load *.lvs platemap file; incorrect format. (Não é possível carregar o ficheiro de mapa de placa *.lvs; formato incorreto.) [AD04]</li> </ul>	O ficheiro LIVS está corrompido.	Não edite o ficheiro LIVS de nenhum modo.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Did not find run for runId &lt;runId&gt; (Corrida para ID de corrida &lt;ID de corrida&gt; não encontrada) [AD05]</li> <li>Did not find sample for sample name &lt;sampleName&gt; (Amostra para nome de amostra &lt;nome de amostra&gt; não encontrada) [AD06]</li> </ul>	Foi selecionado o ficheiro LIVS incorreto ou o ficheiro LIVS está corrompido.	Certifique-se de que seleciona o ficheiro LIVS correto associado ao ensaio analisado.
<ul style="list-style-type: none"> <li>General error loading results data file; please contact technical support. (Erro geral ao carregar o ficheiro de dados de resultados; por favor, contacte o apoio técnico.) [AD07]</li> </ul>	Ocorreu um erro desconhecido.	Contacte o Apoio Técnico.
<ul style="list-style-type: none"> <li>String index out of range: -1 (Índice de sequência fora do intervalo: -1)</li> </ul>	<Nome da amostra> não foi o primeiro atributo selecionado ao configurar a File Name Convention (Convenção do nome de ficheiros) (isto é feito no passo 11.16.14).	Repita a corrida começando no passo 11.12 <i>Deteção por eletroforese capilar</i> — corrija a File Name Convention (Convenção do nome de ficheiros)
<ul style="list-style-type: none"> <li>String index out of range: 15 (Índice de sequência fora do intervalo: 15)</li> </ul>	O ficheiro de resultados CSV foi editado.	Repita a exportação do ficheiro de resultados CSV a partir do software GeneMapper ou do Data Collection Software (Software de recolha de dados). Não edite o ficheiro CSV de nenhum modo.

## 12. Controlo de qualidade

### 12.1. Validade da corrida

12.1.1. O LeukoStrat CDx *FLT3* Software avalia automaticamente os resultados.

12.1.2. Se o estado da corrida for *Fail* (Falha), todos os resultados de teste na mesma corrida são inválidos. Dependendo do *Fail Detail* (Detalhe da falha), a corrida tem de ser repetida em diferentes pontos de início no ensaio (consulte a secção 14: *Retestagem*).

### 12.2. Validade dos controlos da extração e das amostras

12.2.1. Numa corrida válida, amostras individuais poderão ser inválidas (*Fail* (Falha)). Se um controlo da extração não cumprir critérios de validade, todas as amostras associadas a esse controlo da extração serão rotulados com *Fail* (Falha).

12.2.2. As amostras em que todos os controlos são válidos poderão falhar se individualmente não cumprirem especificações. Dependendo do *Fail Detail* (Detalhe da falha) no LeukoStrat CDx *FLT3* Software, a(s) amostra(s) tem/têm de ser repetida(s) em diferentes pontos de início no ensaio (consulte a secção 14: *Retestagem*).

**NOTA:** Se forem observadas numa corrida várias falhas do mesmo tipo de *Fail Detail* (Detalhe da falha), a estratégia de retestagem é diferente daquela de falhas isoladas de controlos ou amostras (consulte a secção 14: *Retestagem*).

## 13. Interpretação dos resultados

- 13.1. Os doentes com LMA com uma mutação do tipo ITD ou do TKD em *FLT3* detetável no limite clínico ou acima deste são indicados para terapêutica com fumarato de gilteritinib.
- 13.2. A razão de sinal mutante:selvagem é calculada pelo LeukoStrat CDx *FLT3* Software e automaticamente comparada com o limite clínico (ponto de decisão médica) de **0,05**. A razão de sinal é a área do pico do sinal mutante, se presente, dividida pela área do pico do sinal selvagem, se presente. A razão de sinal mutante:selvagem é apresentada com duas casas decimais.
- 13.3. Cabe referir que as mutações do tipo ITD poderão conter várias mutações; as áreas dos picos das mutações são somadas para calcular o sinal mutante total. Adicionalmente, uma amostra poderá não conter sinal selvagem (mutante puro). Neste caso, a razão de sinal mutante:selvagem reportada pelo LeukoStrat CDx *FLT3* Software é de 100; não se pretende que expresse um valor de uma razão.
- 13.4. Se a razão de sinal mutante:selvagem para ITD ou TKD num resultado de amostra válido for igual ou superior ao limite clínico de 0,05, o resultado será interpretado como **Positive** (Positivo) e o fumarato de gilteritinib é indicado.
- 13.5. Se as razões de sinal mutante:selvagem para ambos os tipos de mutação ITD e TKD num resultado de amostra válido forem inferiores ao limite clínico de 0,05, o resultado será interpretado como **Negative** (Negativo) e o fumarato de gilteritinib não é indicado.
- 13.6. O estado mutacional de uma amostra é definido pelas regras incluídas na Tabela 10.

**Tabela 10:** Determinação do estado mutacional das amostras

Cenário	Resultado do software para ITD	Razão de sinal para ITD	Resultado do software para TKD	Razão de sinal para TKD	Resultado final do ensaio
1	Positivo	≥ 0,05	Positivo	≥ 0,05	Positivo
2	Negativo	< 0,05	Negativo	< 0,05	Negativo
3	Inválido	N/A	Inválido	N/A	Inválido
4	Positivo	≥ 0,05	Negativo	< 0,05	Positivo
5	Negativo	< 0,05	Positivo	≥ 0,05	Positivo
6	Positivo	≥ 0,05	Inválido	N/A	Positivo
7	Negativo	< 0,05	Inválido	N/A	Inválido
8	Inválido	N/A	Positivo	≥ 0,05	Positivo
9	Inválido	N/A	Negativo	< 0,05	Inválido

- 13.7. Os códigos de detalhes de falha são fornecidos no relatório do LeukoStrat CDx *FLT3* Software; repita a corrida ou volte a testar as amostras de acordo com as instruções na secção 14: *Retestagem*.

## 14. Retestagem

### 14.1. Corridas inválidas

- 14.1.1. Uma corrida em que o controlo positivo ou o controlo sem molde ou ambos não cumprem critérios de validade é uma corrida inválida. Repita a corrida incluindo todas as amostras, controlo positivo, todos os controlos da extração associados e controlo sem molde. As corridas ITD e TKD são independentes uma da outra.
- 14.1.2. Repita a corrida em conformidade com a Tabela 11 ou Tabela 12, com base no ensaio e no(s) detalhe(s) de falha específicos listados na secção *Controls* (Controlos) dos relatórios do LeukoStrat CDx *FLT3* Software. O(s) detalhe(s) de falha listado(s) para o controlo positivo ou controlo sem molde falhado supera(m) todos os detalhes de falha do controlo da extração e das amostras.

### 14.2. Controlo da extração inválido em corridas válidas

- 14.2.1. Para falhas do controlo da extração numa corrida válida que possa conter vários controlos da extração, volte a testar todos os controlos da extração falhados, as amostras associadas, o controlo positivo e o controlo sem molde para a corrida ITD ou TKD apropriada. Volte a testar em conformidade com a Tabela 11 ou Tabela 12, com base no ensaio e no(s) detalhe(s) de falha específicos listados na secção *Controls* (Controlos) dos relatórios do LeukoStrat CDx *FLT3* Software. O(s) detalhe(s) de falha listado(s) para o controlo da extração supera(m) todos os detalhes de falha das amostras.

### 14.3. Amostras inválidas em corridas válidas

- 14.3.1. Para falhas de amostras numa corrida válida, volte a testar a(s) amostra(s), o controlo positivo, o(s) controlo(s) da extração associado(s) à(s) amostra(s) falhada(s) e o controlo sem molde para a corrida ITD ou TKD apropriada. Volte a testar em conformidade com a Tabela 11 ou Tabela 12, com base no ensaio e no(s) detalhe(s) de falha específicos listados na secção *Samples* (Amostras) dos relatórios do LeukoStrat CDx *FLT3* Software. A retestagem de uma amostra tem de incluir a retestagem do controlo da extração associado.

### 14.4. Detalhes de falhas e retestagem

- 14.4.1. A Tabela 11 e a Tabela 12 resumem a retestagem com base nos detalhes de falhas por tipo de amostra para ITD e TKD, respetivamente. Consulte a Tabela 13 para ver os códigos de retestagem listados na Tabela 11 e na Tabela 12.
- 14.4.2. A hierarquia de retestagem é a seguinte:
  - 1) Controlo positivo (CP) ou controlo sem molde (CSM) para ITD ou TKD inválido (consulte a secção 14.1)
  - 2) Controlo da extração (CE) inválido numa corrida válida (ver secção 14.2)
  - 3) Amostras inválidas numa corrida válida (ver secção 14.3)

A Figura 9 apresenta um diagrama da hierarquia de retestagem.

- 14.4.3. Se tiver ocorrido mais de uma falha numa única amostra ou controlo, realize a retestagem que faz o operador regressar ao passo mais próximo do início do procedimento do ensaio.
  - 14.4.3.1. Se ocorrer o mesmo detalhe de falha no mesmo controlo/amostra, continue para o ponto de início de retestagem seguinte, se existir. Se ocorrer o mesmo detalhe de falha de novo depois de serem realizadas todas as ações da resolução de problemas, o resultado do controlo/amostra é inválido.
  - 14.4.3.2. Se os resultados da retestagem apresentarem um tipo de falha diferente dos resultados iniciais, siga a ação de resolução de problemas descrita para o novo tipo de falha da retestagem.

**NOTA:** Não são permitidas mais de quatro retestagens para um único controlo/amostra.

- 14.4.4. As amostras inválidas são avaliadas de forma independente; assim, se várias amostras com diferentes detalhes de falha para cada amostra forem identificadas numa única corrida, realize a retestagem que for apropriada para cada amostra.

**NOTA:** Se for necessária assistência adicional, queira por favor entrar em contacto com o Apoio Técnico da Invivoscribe através do endereço de correio eletrónico [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com).



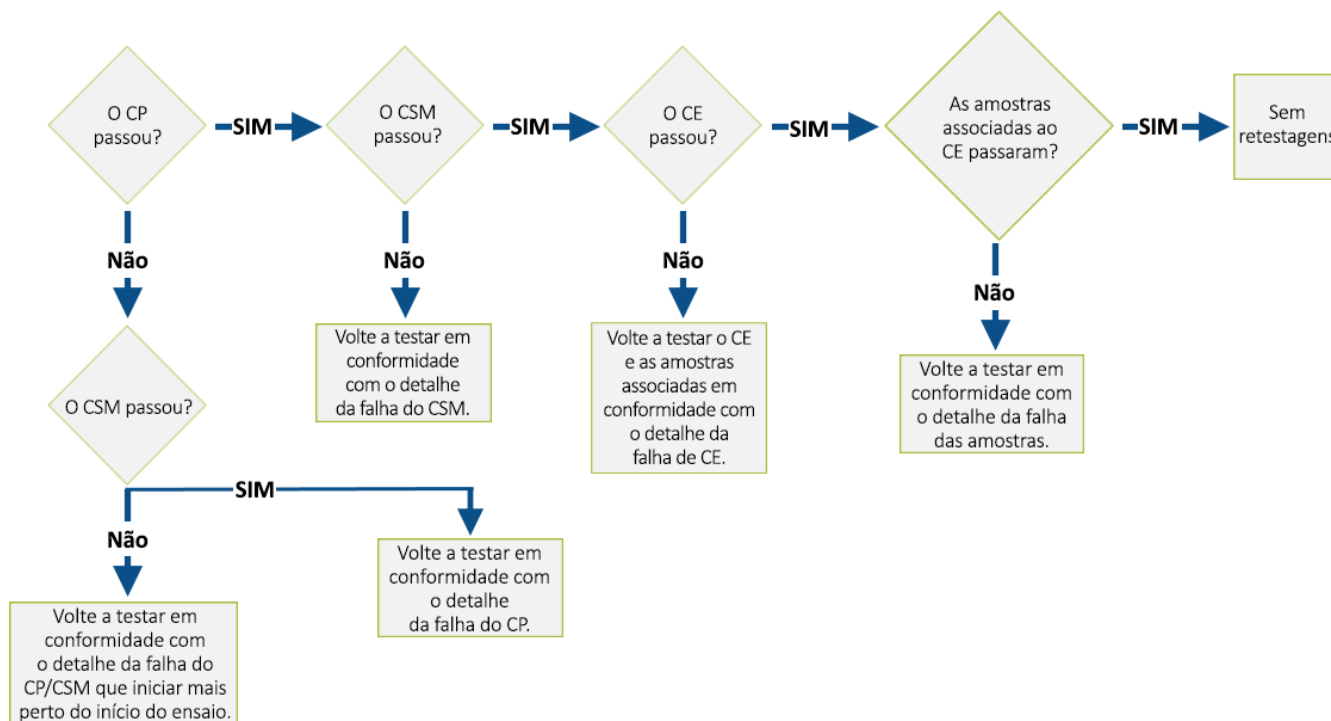


Figura 9. Diagrama da hierarquia de retestagem

Tabela 11: Retestagem de controles e amostras para ITD

Detalhe de falha para ITD	Controles			Amostras	
	CP	CSM	CE	Amostra pos.	Amostra neg.
<b>IR05:</b> Sample or Control Failed. (Ocorreu uma falha de amostra ou controle.)	Amp.		Amp.		Quant./Proc.
<b>IR06:</b> Sample or Control Failed. (Ocorreu uma falha de amostra ou controle.)	Amp.				Quant./Proc.
<b>IR07:</b> Sample Failed. (Ocorreu uma falha de amostra.)				EC-MS	EC-MS
<b>IR09:</b> Sample or Control Failed. (Ocorreu uma falha de amostra ou controle.)	EC	EC	EC	EC/Proc.	EC/Proc.
<b>IR12:</b> Sample or Control Failed. (Ocorreu uma falha de amostra ou controle.)	Amp.		Q-Amp.	Quant./Proc.	Quant./Proc.
<b>IR13:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)	EC				
<b>IR20:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)				Contr.	Contr.
<b>IR21:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)				Contr.	Contr.
<b>IR31:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)	Amp.				
<b>IR32:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)	EC/Amp.				
<b>IR33:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)	EC/Amp.				
<b>IR34:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)	Amp.				
<b>IR40:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)		Amp.			
<b>IR51:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)			Q-Amp.		
<b>IR52:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)			EC/Q-Amp.		
<b>IR53:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controle.)				Contr.	Contr.
<b>IR70:</b> Sample Failed. (Ocorreu uma falha de amostra.)				EC/Proc.	
<b>IR80:</b> Sample Failed. (Ocorreu uma falha de amostra.)					Quant./Proc.
<b>IR91:</b> Sample or Control Failed. (Ocorreu uma falha de	EC	EC	EC	EC	EC

**Tabela 12:** Retestagem de controlos e amostras para TKD

Detalhe de falha para TKD	Controlos			Amostras	
	CP	CSM	CE	Amostra pos.	Amostra neg.
<b>TR07:</b> Sample or Control Failed. (Ocorreu uma falha de amostra ou controlo.)	Dig.		Dig.		Dig./Proc.
<b>TR09:</b> Sample or Control Failed. (Ocorreu uma falha de amostra ou controlo.)	EC	EC	EC	EC/Proc.	EC/Proc.
<b>TR12:</b> Sample or Control Failed. (Ocorreu uma falha de amostra ou controlo.)	Amp.		Q-Amp.	Quant./Proc.	Quant./Proc.
<b>TR20:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)				Contr.	Contr.
<b>TR21:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)				Contr.	Contr.
<b>TR30:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)	Xtalk/Amp.				
<b>TR31:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)	EC/Amp.				
<b>TR32:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)	EC/Amp.				
<b>TR33:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)	Amp.				
<b>TR40:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)		Amp.			
<b>TR50:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)			Xtalk/Q-Amp.		
<b>TR51:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)			EC/Q-Amp.		
<b>TR52:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)			Dig.		
<b>TR53:</b> Control Failed. (Ocorreu uma falha do controlo.)				Contr.	Contr.
<b>TR70:</b> Sample Failed. (Ocorreu uma falha de amostra.)				Xtalk/Quant./Proc.	
<b>TR71:</b> Sample Failed. (Ocorreu uma falha de amostra.)				EC/Proc.	
<b>TR72:</b> Sample Failed. (Ocorreu uma falha de amostra.)				Dig./Proc.	
<b>TR80:</b> Sample Failed. (Ocorreu uma falha de amostra.)					Xtalk/Quant./Proc.
<b>TR81:</b> Sample Failed. (Ocorreu uma falha de amostra.)					Quant./Proc.
<b>TR93:</b> Sample or Control Failed. (Ocorreu uma falha de amostra ou controlo.)	EC	EC	EC	EC	EC

Tabela 13: Códigos de retestagem

Código de retestagem	Descrição	Ponto de início da retestagem
Amp.	Repita começando na amplificação, utilizando diluições da amostra de ADN realizadas previamente.	11.10. <i>Amplificação</i>
EC	Repita começando na eletroforese capilar. Prepare uma nova placa de EC com produto amplificado fresco (proveniente da placa de PCR para ITD ou da placa de digestão do TKD guardada) certificando-se de que o controlo positivo, o controlo sem molde e o(s) controlo(s) da extração associado(s) estão também presentes na placa com uma amostra falhada.	11.12. <i>Deteção por eletroforese capilar</i>
EC/Amp. EC/Q-Amp.	Volte a testar seguindo as instruções do código de retestagem da EC. Se os resultados da retestagem produzirem o mesmo detalhe de falha, teste de novo seguindo as instruções de Amp. ou Q-Amp., conforme indicado.	11.12. <i>Deteção por eletroforese capilar</i> 11.9. <i>Quantificação e diluição do ADN</i> 11.10. <i>Amplificação</i>
EC/Proc.	Volte a testar seguindo as instruções do código de retestagem da EC. Se os resultados da retestagem produzirem o mesmo detalhe de falha, reprocessse a amostra começando a partir do sangue periférico ou aspirado de medula óssea.	11.12. <i>Deteção por eletroforese capilar</i> 11.2. <i>Preparação para o processamento de amostras</i>
EC-MS	Repita começando na eletroforese capilar. Prepare uma nova placa de EC com produto amplificado fresco (proveniente da placa de PCR para ITD guardada) certificando-se de que o controlo positivo, o controlo sem molde e o(s) controlo(s) da extração associado(s) estão também presentes na placa (consulte a secção 14.6 <i>Mudança de corante</i> ). Se ocorrer o mesmo detalhe de falha (IR07) uma segunda vez, reporte a amostra como inválida.	11.12. <i>Deteção por eletroforese capilar</i>
Contr.	Volte a testar seguindo as instruções do controlo que falhou.	Varia
Dig.	Repita começando na digestão, usando produto amplificado novo (proveniente da placa de PCR para TKD guardada) da(s) amostra(s), controlo(s) da extração associado(s) e controlos.	11.11. <i>Digestão por enzima de restrição (apenas mutação do TKD)</i>
Dig./Proc.	Volte a testar seguindo as instruções do código de retestagem da Dig. Se os resultados da retestagem produzirem o mesmo detalhe de falha, reprocessse a amostra começando a partir do sangue periférico ou aspirado de medula	11.11. <i>Digestão por enzima de restrição (apenas mutação do TKD)</i> 11.2. <i>Preparação para o processamento de</i>
Q-Amp.	Repita começando na quantificação do(s) controlo(s) da extração, usando diluições da amostra de ADN realizadas previamente.	11.9. <i>Quantificação e diluição do ADN</i> 11.10. <i>Amplificação (amostras)</i>
Quant.	Repita começando na quantificação de todas as amostras e controlo(s) da extração associado(s).	11.9. <i>Quantificação e diluição do ADN</i> 11.10. <i>Amplificação (amostras)</i>
Quant./Proc.	Volte a testar seguindo as instruções do código de retestagem da Quant. Se os resultados da retestagem produzirem o mesmo detalhe de falha, reprocessse a amostra começando a partir do sangue periférico ou aspirado de medula óssea.	11.9. <i>Quantificação e diluição do ADN</i> 11.2. <i>Preparação para o processamento de amostras</i>
Xtalk/Amp. Xtalk/Q-Amp. Xtalk/Quant./Proc.	Prepare uma nova placa de EC de modo a que todas as amostras estejam separadas por 5 capilares vazios (ou seja, carregue amostras apenas nos poços A01, C01, E01 e G01 para a injeção 1. Carregue amostras nos poços equivalentes para as injeções restantes). Se os resultados da retestagem produzirem o mesmo detalhe de falha, teste de novo seguindo as instruções de Amp., Q-Amp. ou Quant. conforme indicado. Se os resultados da retestagem de Quant. produzirem o mesmo detalhe de falha, reprocessse a amostra começando a partir do sangue periférico ou aspirado de medula óssea.	11.12. <i>Deteção por eletroforese capilar</i> 11.9. <i>Quantificação e diluição do ADN (Controlo(s) da extração)</i> 11.10. <i>Amplificação (Amostras, CP)</i> 11.2. <i>Preparação para o processamento de amostras</i>

#### 14.5. Várias falhas numa corrida

- 14.5.1. Ao contrário dos resultados de amostras ou controlos inválidos isolados, alguns detalhes de falha podem ser observados em vários ou todos os poços da reação. Quando ocorrer este tipo de falha, repita a corrida incluindo todas as amostras, controlo positivo, todos os controlos da extração associados e o controlo sem molde de acordo com a Tabela 14; os códigos de retestagem estão listados na Tabela 15.
- 14.5.2. As ações adicionais de resolução de problemas poderão incluir os itens que se seguem:

- 14.5.2.1. Abrir o ficheiro CSV para confirmar que contém os resultados para todos os poços de amostras e controlos que têm associado um ficheiro FSA do instrumento 3500xL ou 3500xL Dx.
- 14.5.2.2. No ficheiro CSV, certifique-se de que estão presentes as colunas corretas, que os limites dos picos estão corretos (ou seja, sem picos com menos de 100 no Blue (Azul) e no Green (Verde) ou menos de 50 no Red (Vermelho)) e que as colunas estão preenchidas com valores diferentes de zero.

**Tabela 14:** Retestagem; várias falhas numa corrida

Tipo de amostra	Detalhe de	Código de
CP para ITD	IR31	Amp.
CSM para ITD	IR40	
CE para ITD	IR51	
CP para TKD	TR30	
CSM para TKD	TR40	
CE para TKD	TR50	
CP para ITD	IR33	EC/Amp.
Amostra para ITD	IR70	
CP para TKD	TR32	
Amostra para TKD	TR71	
CP para ITD	IR32	
CE para ITD	IR52	
Amostra para ITD	IR80	
CP para TKD	TR31	
CE para TKD	TR51	EC-PT
Amostra para TKD	TR81	
Todos os referentes a ITD numa injeção	IR91	EC-PT
Todos os referentes a TKD numa injeção	TR93	
Todos os referentes a ITD numa corrida	IR04	EC (DCS) ou GM (GeneMapper)
Todos os referentes a TKD numa corrida	TR04	

**Tabela 15:** Códigos de retestagem; retestagem de falhas múltiplas

Código de retestagem	Descrição	Ponto de início da retestagem
Amp.	Repita começando na amplificação, usando diluições de ADN das amostras de teste realizadas previamente. Certifique-se de que todos os tubos são agitados no vórtex em conformidade com as instruções e que a Taq foi adicionada.	11.10. <i>Amplificação</i>
EC	No caso de usar o DCS para a análise de dados, repita começando na eletroforese capilar. Prepare uma nova placa de EC com produto amplificado novo (proveniente da placa de PCR para ITD ou da placa de digestão do TKD guardada) e solução de padrões de tamanho nova. Certifique-se de que o controlo positivo, o controlo sem molde e o(s) controlo(s) da extração associado(s) estão também presentes na placa com uma amostra falhada.	11.12. <i>Deteção por eletroforese capilar</i>
GM	No caso de usar o GeneMapper para a análise de dados, repita a criação de ficheiros de dados exportados a partir do software GeneMapper, certificando-se de que o(s) limite(s) está/estão definido(s) para 100 RFU (UFR) para blue (azul) e green (verde).	11.18 <i>Análise de dados com o software GeneMapper</i>
EC/Amp.	Volte a testar seguindo as instruções do código de retestagem da EC. Se os resultados da retestagem produzirem o mesmo detalhe de falha, teste de novo seguindo as instruções de Amp.	11.12. <i>Deteção por eletroforese capilar</i> 11.10. <i>Amplificação</i>
EC-PT	Repita começando na eletroforese capilar, usando uma nova preparação de solução de padrões de tamanho.	11.12. <i>Deteção por eletroforese capilar</i>

## 14.6. Mudança de corante

Em casos raros com alguns insertos de ITD de grande dimensão, o LeukoStrat CDx *FLT3* Software poderá não identificar corretamente a confirmação de um pico mutante. Para confirmar a mudança de corante, repita a eletroforese capilar preparando uma nova placa de EC com produto amplificado novo proveniente da placa de PCR para ITD guardada.

## 15. Limitações do procedimento

- 15.1. Teste apenas os tipos de amostras indicados, pois o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay foi validado para utilização apenas com sangue periférico e aspirado de medula óssea. A obtenção de resultados fiáveis depende do correto armazenamento e processamento das amostras; assim sendo, siga os procedimentos que constam nesta brochura incluída na embalagem.
- 15.2. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay foi validado utilizando apenas o QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit para extrair ADN genómico.
- 15.3. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay detetará mutações do tipo ITD com tamanho entre 3 pb e 323 pb; no entanto, o ensaio apenas está validado para detetar mutações com tamanho entre 30 pb e 279 pb.
  - As inserções do tipo ITD com tamanho entre 3 pb e 30 pb serão reportadas como mutações do tipo ITD.
  - As inserções do tipo ITD com tamanho entre 279 pb e 323 pb serão reportadas como mutações do tipo ITD.
  - As inserções do tipo ITD com tamanho superior a 323 pb não são detetáveis pelo ensaio.
- 15.4. Este ensaio poderá não detetar mutações de *FLT3* que se apresentem abaixo do nível de sensibilidade do ensaio.
  - 15.4.1. Para inserções do tipo ITD com tamanho entre 30 pb e 126 pb, inclusive, uma razão alélica de 0,08 produzirá um resultado positivo no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
  - 15.4.2. Para inserções do tipo ITD com tamanho entre 129 pb e 279 pb, inclusive, uma razão alélica de 1 produzirá um resultado positivo no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
  - 15.4.3. Para mutações do TKD que modifiquem o local da EcoRV, uma razão alélica de 0,18 produzirá um resultado positivo no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 15.5. Este ensaio apresenta diferentes taxas de variabilidade da razão de sinal dependendo do tipo de mutação de *FLT3*, conforme apresentado abaixo.
  - 15.5.1. Para inserções do tipo ITD com tamanho entre 21 pb e 90 pb, inclusive, a variabilidade da razão de sinal situa-se entre 4,4% e 8,5%.
  - 15.5.2. Para inserções do tipo ITD com tamanho de 217 pb, a variabilidade da razão de sinal situa-se entre 26,9% e 27,2%.
  - 15.5.3. Para mutações do TKD que modificam o local da EcoRV, a variabilidade da razão de sinal situa-se entre 4,2% e 5,9%.
- 15.6. Os resultados do ensaio devem sempre ser interpretados no contexto dos dados clínicos e outros testes realizados para o doente.
- 15.7. Foi determinado que o desempenho clínico do teste usando dados provenientes do estudo de exatidão clínica é de:
  - 15.7.1. Sensibilidade diagnóstica: 1
  - 15.7.2. Especificidade diagnóstica: 0,92
  - 15.7.3. Razão de probabilidade de positivo: 12,5
  - 15.7.4. Razão de probabilidade de negativo: 0
- 15.8. A deteção de uma mutação depende do número de cópias da sequência mutante presentes na amostra e poderá ser afetada pela integridade da amostra, quantidade de ADN isolado e presença de substâncias interferentes. Os ensaios baseados em PCR estão sujeitos a interferências por degradação do ADN ou inibição da PCR devido a EDTA e outros agentes.
- 15.9. O uso deste produto tem de estar limitado a pessoal com formação nas técnicas de PCR e na utilização do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.
- 15.10. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay é um teste qualitativo. O teste não é destinado a medições quantitativas de mutações do tipo ITD ou do TKD.
- 15.11. A razão alélica de uma amostra não pode ser calculada, medida ou determinada usando este ensaio.

## 16. Valores esperados

### 16.1. Tamanho esperado dos produtos amplificados

- 16.1.1. Os tamanhos dos produtos amplificados listados foram determinados usando um instrumento 3500xL e 3500xL Dx (Tabela 16).

**NOTA:** “Canal do corante” indica a cor dos produtos gerados com a Master Mix quando é utilizada a atribuição de cor predefinida nos sistemas de detecção por fluorescência ABI.

**Tabela 16:** Tamanhos dos produtos amplificados previstos

Master Mix	Ref. n.º	Alvo	Canal do corante	ADN de controlo	Tamanho do produto em nucleótidos
<i>FLT3</i> ITD	R0880060 R0880080	Exão 14 e 15	<b>Azul e Verde</b>	<b>Intervalo de tamanho válido</b> ADN de controlo positivo para mutações do tipo ITD de <i>FLT3</i> ADN de controlo da extração de <i>FLT3</i>	<b>326-650</b> 327±1, 357±1 327±1
<i>FLT3</i> TKD	R0880070 R0880080	Exão 20	<b>Azul</b>	<b>Intervalo de tamanho válido</b> ADN de controlo positivo para mutações do TKD de <i>FLT3</i> ADN de controlo da extração de <i>FLT3</i>	<b>78-80, 124-128</b> 79±1, 127±1 79±1, 127±1 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>**Nota:** Poderá estar presente ou não um pequeno pico de produto com 127 pb no controlo da extração.

## 17. Avaliação do desempenho não clínico

### 17.1. Sensibilidade analítica – limite do branco (LB)

Quando foram testadas no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay amostras que contêm apenas ADN selvagem (ou seja, um branco de mutante), a RS foi de 0,00 no ensaio para ITD e de entre 0,00 e 0,01 no ensaio para TKD. Este limite do branco está bem abaixo da RS do limite clínico de 0,05.

### 17.2. Sensibilidade analítica

17.2.1. O limite de detecção (LD) do ensaio foi avaliado em dois estudos. O primeiro estudo usou amostras artificiais criadas misturando linhagens celulares com sangue total sem leucócitos. Foram usadas amostras de linhagens celulares para representar quatro tamanhos de insertos do tipo ITD: inserto de 21 pb, inserto de 30 pb, inserto de 126 pb e inserto de 279 pb. Foi também avaliada uma linhagem celular adicional contendo a mutação D835. O ADN foi diluído a 5 ng/μL, 10 ng/μL e 15 ng/μL e testado em várias razões alélicas para cada linhagem celular. Foi realizado um segundo estudo com amostras clínicas para confirmar as observações de LD obtidas com linhagens celulares. Cinco amostras clínicas foram diluídas com amostras clínicas negativas de modo a produzir uma razão de sinal alvo (RSA) dentro do intervalo linear de um padrão de linhagens celulares apropriado (Tabela 17). Cada amostra foi diluída a 5 níveis, representando um negativo baixo (NB), um negativo alto (NA), perto do limite (LI), um positivo baixo (PB) e um positivo moderado (PM). Estas amostras num intervalo linear foram testadas no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay e foi determinado um valor de RS médio. Cada diluição de amostra de LD clínico foi testada 20 vezes para cada nível de diluição ao longo de quatro dias não consecutivos (5 réplicas por dia) por um operador a usar um conjunto de equipamentos. A razão alélica (RA) de cada diluição de amostra de LD clínico foi calculada usando as RA estimadas provenientes das curvas padrão das linhagens celulares. As RA das amostras de LD clínico foram estimadas com base no cumprimento por parte do estudo dos seguintes critérios de aceitação:

- RS e RA em que é possível detetar mutações de *FLT3* acima do limite do branco (LB) em ≥ 95% das réplicas (LD analítico).
- RA perto do limite clínico, uma RS de 0,04 – 0,06 (limite).
- RA e RS que se deteta igual ou acima do limite clínico em ≥ 95% das réplicas (acima do limite).

Tabela 17: RS, RA e LD para cada amostra e nível de diluição

ID da amostra	Mutação	Nível	RSA	RS média	RA da mistura	N válido	N (%) RS > LB	N (%) RS ≥ 0,05	*Classificação
TKD CS1	TKD I836	NB	0,02	0,02	0,039	20	20 (100,0)	0	LD analítico
		NA	0,03	0,03	0,057	20	20 (100,0)	0	-
		LI	0,05	0,05	0,094	20	20 (100,0)	16 (80,0%)	Limite
		PB	0,08	0,07	0,144	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Acima do limite
		PM	0,13	0,12	0,224	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
TKD CS2	TKD D835	NB	0,01	0,02	0,023	20	20 (100,0)	0	LD analítico
		NA	0,02	0,03	0,047	20	20 (100,0)	0	-
		LI	0,04	0,05	0,089	20	20 (100,0)	19 (95,0)	Limite Acima do limite
		PB	0,07	0,08	0,152	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
		PM	0,13	0,15	0,269	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
ITD CS1	ITD 24 pb	NB	0,02	0,02	0,044	20	20 (100,0)	0	LD analítico
		NA	0,03	0,03	0,065	20	20 (100,0)	0	-
		LI	0,05	0,05	0,107	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Limite Acima do limite
		PB	0,08	0,08	0,165	20	19 (95,0)	19 (95,0)	-
		PM	0,13	0,13	0,257	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
ITS-CS2	ITD 66 pb	NB	0,02	0,02	0,045	20	20 (100,0)	0	LD analítico
		NA	0,03	0,03	0,066	20	20 (100,0)	0	-
		LI	0,05	0,05	0,110	20	20 (100,0)	18 (90,0)	Limite
		PB	0,09	0,08	0,189	20	20 (100,0)	20 (100,0)	Acima do limite
		PM	0,14	0,13	0,280	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
ITD CS3	ITD 217 pb	NB	0,01	0	0,073	20	2 (10,0)	0	-
		NA	0,02	0,02	0,147	20	15 (75,0)	0	-
		LI	0,04	0,04	0,276	20	20 (100,0)	9 (45,0)	LD analítico Limite
		PB	0,08	0,08	0,539	20	19 (95,0)	19 (95,0)	Acima do limite
		PM	0,13	0,13	0,838	20	20 (100,0)	20 (100,0)	-
<b>ITD negativo verdadeiro</b>	Nenhuma	NV	N/A	0	0	20	0	0	N/A
<b>TKD negativo verdadeiro</b>	Nenhuma	NV	N/A	0	0	20	0	0	N/A

\*As classificações são definidas como 1: LD analítico = RA mais baixa em que as amostras foram detetadas 95% das vezes acima do LB; 2: Limite = RA em que as amostras estavam perto de uma RS de 0,05; e 3: Acima do limite = RA mais baixa em que as amostras puderam ser detetadas 95% das vezes com RS igual ou acima de 0,05.

17.2.2. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay consegue detetar as seguintes razões alélicas mutante/selvagem acima do limite clínico dos seguintes tipos de mutação:



- 17.2.2.1. Para inserções do tipo ITD com tamanho de 24 pb, foi detetada uma razão alélica de 0,107 acima da RS limite em mais de 95% das amostras. O coeficiente de variação (%CV) da RS para estas amostras foi de 7,1%.
- 17.2.2.2. Para inserções do tipo ITD com tamanho de 66 pb, foi detetada uma razão alélica de 0,189 acima da RS limite em mais de 95% das amostras. O %CV da RS para estas amostras foi de 7,1%.
- 17.2.2.3. Para inserções do tipo ITD com tamanho de 217 pb, foi detetada uma razão alélica de 0,539 acima da RS limite em mais de 95% das amostras. O %CV da RS para estas amostras foi de 25,6%.
- 17.2.2.4. Para mutações do TKD em D835 que destroem o local da EcoRV, foi detetada uma razão alélica de 0,089 acima da RS limite em mais de 95% das amostras. O %CV da RS para estas amostras foi de 4,5%.
- 17.2.2.5. Para mutações do TKD em I836 que destroem o local da EcoRV, foi detetada uma razão alélica de 0,144 acima da RS limite em mais de 95% das amostras. O %CV da RS para estas amostras foi de 5,7%.
- 17.2.2.6. A conversão de valores de RA para percentagem de mutante é mostrada na tabela que se segue.

**Tabela 18:** Razão alélica da sensibilidade analítica e % de mutante

ID da amostra	Mutação	Classificação da mutação	Acima do limite 95%, RS ≥ 0,05		
			RA	RS	% mut.
TKD CS1	TKD I836	Deleção em TKD I836	0,144	0,07	12,6
TKD CS2	TKD D835	Substituição em TKD D835	0,089	0,05	8,2
ITD CS1	ITD 24 pb	Pequeno inserto do tipo ITD < 30 pb	0,107	0,05	9,7
ITD CS2	ITD 66 pb	Inserto mediano do tipo ITD 30-100 pb	0,189	0,08	15,9
ITD CS3	ITD 217 pb	Grande inserto do tipo ITD ~200 pb	0,539	0,08	35,0

### 17.3. Precisão

- 17.3.1. A precisão do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay foi determinada por três operadores a testar independentemente 10 réplicas cada de amostras de mutações do tipo ITD com insertos de tamanho entre 21 pb e 126 pb e amostras de mutações do TKD. As 10 réplicas foram testadas em lotes de dois, num total de cinco vezes distintas.
- 17.3.2. Para as amostras de mutações do tipo ITD, os intervalos do %CV da RS para os três operadores situaram-se entre 7,4% e 15,0%, entre 3,7% e 13,0% e entre 4,2% e 8,8%.
- 17.3.3. Para as amostras de mutações do TKD, os intervalos do %CV da RS para os três operadores situaram-se entre 6,3% e 11,2%, entre 5,8% e 9,3% e entre 5,5% e 8,3%.

### 17.4. Reprodutibilidade interoperador (linhagens celulares)

- 17.4.1. As amostras eram compostas por linhagens de células de ITD contendo insertos de 21 pb, 30 pb e 126 pb e a mutação do TKD em D835. As amostras representaram RS mutante: selvagem baixas (perto do limite), médias e altas (linhagem celular 100% mutante) para pequeno inserto do tipo duplicação interna em tandem (internal tandem duplication, ITD), grande inserto do tipo ITD e mutação do domínio da tirosina cinase (tyrosine kinase domain, TKD). Três operadores a usar um lote de reagentes e um instrumento ao longo de 15 corridas testaram 10 réplicas cada. O %CV da RS variou entre 6,6% e 13,3%.
- 17.4.2. Para as amostras da mutação do TKD, o %CV da RS variou entre 7,9% e 9,3%.
- 17.4.3. Para as amostras de mutações do tipo ITD incluindo insertos de até 30 pb, inclusive, o %CV da RS variou entre 6,6% e 9,4%.
- 17.4.4. Para as amostras de mutações do tipo ITD com insertos de 126 pb, o %CV da RS variou entre 9,0% e 13,3%.

### 17.5. Reprodutibilidade interoperador (amostras clínicas)

- 17.5.1. Num segundo estudo, a precisão foi avaliada usando amostras de ADN clínicas provenientes de 7 amostras clínicas (5 de SP e 2 de MO) com comprimentos da ITD de 21 pb, 24 pb, 66 pb, 90 pb e 217 pb, substituição no TKD em D835, deleção no TKD em I836 e 8 amostras (4 de SP e 4 de MO) negativas para mutações de *FLT3*. O ADN das amostras clínicas negativas para mutações de *FLT3* foi agrupado e usado para diluir as amostras positivas para mutações de *FLT3* de modo a obter três níveis de RS alvo perto do limite clínico do ensaio (nomeadamente, negativo alto, positivo baixo e positivo moderado). Cinco amostras clínicas positivas para mutações de *FLT3* tiveram origem em SP e duas em MO. Três réplicas de 5 amostras positivas para ITD, 2 amostras positivas para TKD e uma amostra negativa verdadeira agrupada foram testadas por três operadores/conjuntos de instrumentos diferentes usando 1 lote de reagentes ao longo de cinco dias não consecutivos, em três níveis de diluição para as amostras positivas e sem diluição para a amostra negativa. Cada operador testou 15 réplicas no total por nível, totalizando 45 réplicas por nível de diluição.
- 17.5.2. Os %CV totais para todos os tipos de mutações e níveis são mostrados na Tabela 19 abaixo. Os %CV para todos os tipos de mutações, exceto a amostra de grande inserto do tipo ITD (217 pb), variaram entre 4,2% e 16,1%. Os %CV para a amostra com uma mutação de 217 pb variaram entre 26,9% e 27,2%. O %CV para o nível de diluição do positivo baixo (PB) foi de 26,9% para 217 pb, falhando assim os critérios de aceitação do estudo de  $CV \leq 25\%$  para a RS. Os resultados mostram que os critérios de aceitação foram cumpridos para ambas as mutações do TKD em D835 e I836 e para as mutações do tipo ITD até 217 pb. A variação para a mutação do tipo ITD de 217 pb excedeu 25%, indicando assim uma maior imprecisão em torno das ITD de maior tamanho.

**Tabela 19:** Componentes de variação por tipo de mutação e nível de diluição

ID da amostra	Tipo de mut.	Nível de diluição	RS média	Variação da RS devido a			Variação total	
				DP do operador/ instrumento (%)	DP do dia da corrida (%)	DP de erro aleatório (%)	DP	% CV
S1	TKD I836	NA	0,03	0,000 (3,22%)	0,000 (0,00%)	0,002 (96,78%)	0,002	7,1
		PB	0,077	0,001 (2,60%)	0,000 (0,00%)	0,005 (97,40%)	0,005	5,9
		PM	0,132	0,002 (6,67%)	0,003 (17,43%)	0,005 (75,90%)	0,006	4,6
S2	TKD D835	NA	0,04	0,001 (7,13%)	0,000 (0,00%)	0,002 (92,87%)	0,002	5,3
		PB	0,08	0,002 (14,02%)	0,001 (2,47%)	0,004 (83,51%)	0,004	5,3
		PM	0,165	0,003 (16,28%)	0,000 (0,00%)	0,007 (83,72%)	0,007	4,2
S3	ITD 21 pb	NA	0,03	0,000 (0,00%)	0,000 (0,00%)	0,001 (100,0%)	0,001	5
		PB	0,074	0,000 (0,00%)	0,002 (8,08%)	0,005 (91,92%)	0,005	7,2
		PM	0,133	0,002 (14,46%)	0,000 (0,00%)	0,005 (85,54%)	0,006	4,4
S4	ITD 24 pb	NA	0,029	0,000 (0,00%)	0,000 (0,00%)	0,004 (100,0%)	0,004	15,2
		PB	0,07	0,000 (0,00%)	0,000 (0,92%)	0,004 (99,08%)	0,004	5,3
		PM	0,147	0,002 (8,20%)	0,001 (3,28%)	0,006 (88,52%)	0,007	4,5
S5	ITD 66 pb	NA	0,029	0,001 (4,28%)	0,000 (0,00%)	0,005 (95,72%)	0,005	16,1
		PB	0,083	0,000 (0,00%)	0,001 (1,13%)	0,007 (98,87%)	0,007	8
		PM	0,185	0,000 (0,00%)	0,000 (0,00%)	0,010 (100,0%)	0,01	5,3
S6	ITD 90 pb	NA	0,03	0,001 (5,15%)	0,000 (0,00%)	0,003 (94,85%)	0,003	10,1
		PB	0,091	0,004 (25,23%)	0,002 (8,42%)	0,007 (66,35%)	0,008	8,5
		PM	0,206	0,013 (44,26%)	0,005 (7,34%)	0,013 (48,40%)	0,019	8,5
S7	ITD 217 pb	NA	0,032	0,001 (0,90%)	0,002 (7,20%)	0,008 (91,90%)	0,009	27,2
		PB	0,079	0,013 (31,42%)	0,009 (14,86%)	0,017 (53,71%)	0,023	26,9
		PM	0,162	0,029 (36,75%)	0,015 (9,86%)	0,035 (53,39%)	0,047	27,2

## 17.6. Reprodutibilidade interlote e interinstrumento

- 17.6.1. A reprodutibilidade interlote e interinstrumento foi determinada por um único operador a testar o mesmo conjunto de amostras usando três lotes de reagentes em três conjuntos de instrumentos. As amostras de linhagens celulares consistiram em amostras de ITD contendo insertos com tamanho entre 21 pb e 126 pb e amostras de mutações do TKD.
- 17.6.2. Para as amostras de mutações do tipo ITD, o %CV da RS variou entre 3,0% e 8,4%.
- 17.6.3. Para as amostras de mutações do TKD, o %CV da RS variou entre 5,4% e 10,6%.

## 17.7. Substâncias interferentes — exógenas

- 17.7.1. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay consegue detectar mutações do tipo ITD com tamanho entre 18 pb e 114 pb e mutações do TKD na presença de heparina sódica e do tampão de lavagem usado durante o processo de isolamento de ADN.

## 17.8. Substâncias interferentes — endógenas

- 17.8.1. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay consegue detectar mutações do tipo ITD com tamanho entre 18 pb e 114 pb e mutações do TKD na presença de lipídios/triglicerídeos, hemoglobina, proteína e bilirrubina.

## 17.9. Substâncias interferentes — fármacos do tratamento

- 17.9.1. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay consegue detectar mutações do tipo ITD com tamanho entre 18 pb e 114 pb e mutações do TKD na presença de citarabina e daunorrubicina.

## 17.10. Contaminação cruzada e por arrasto

- 17.10.1. Foi demonstrado que a contaminação cruzada e por arrasto não foram problemáticas para o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, quando confrontado com configurações de mapas de placas em padrão de xadrez típico:
- 17.10.1.1. A contaminação cruzada/por arrasto detetada foi 0%.
  - 17.10.1.2. A taxa de falhas do controlo sem molde para ITD e TKD foi 0%.

## 17.11. Quantidade de ADN

- 17.11.1. O objetivo deste estudo foi fornecer evidências que demonstrassem equivalência ao usar quantidades de ADN de  $10 \pm 3$  ng/ $\mu$ L no ensaio. As réplicas de ADN extraído provenientes do estudo do limite de deteção e do intervalo dinâmico com amostras artificiais foram usadas para testar apenas os elementos do painel de amostras de razão alélica mais baixa. As amostras de ADN listadas abaixo foram diluídas a 7, 10 e 13 ng/ $\mu$ L e testadas com o ensaio juntamente com uma réplica única de controlo negativo.
- RA de 0,03, ITD de 30 pb (33 réplicas em cada nível de quantidade de ADN)
  - RA de 0,05, D835 TKD (33 réplicas)
  - RA de 0,05, ITD de 126 pb (22 réplicas)
  - RA de 1, ITD de 279 pb (11 réplicas)
- 17.11.2. Os critérios de aceitação foram cumpridos para amostras de linhagens celulares de ITD de 30 pb, ITD de 126 pb e D835 TKD: 1) > 93,9% das réplicas cumpriram os critérios de validade de amostras para todos os tipos de amostra e quantidades de ADN; 2) o coeficiente de variação (CV) global foi < 20,5% para todos os tipos de amostra; e 3) o CV foi < 21,0% para todos os tipos de amostra quando as réplicas foram agrupadas em quantidades de ADN entre 7 e 10 ng/ $\mu$ L e entre 13 e 10 ng/ $\mu$ L. Os critérios de aceitação não foram cumpridos para a linhagem celular de inserto do tipo ITD longo: embora 100% das réplicas tenham cumprido os critérios de validade de amostras, o CV global e o CV entre quantidades de ADN agrupadas ultrapassaram 25%.
- 17.11.3. A diferença nas RS mutante:selvagem médias entre quantidades de ADN não excedeu 0,022 e as diferenças entre médias não foram significativamente diferentes. O ensaio consegue proporcionar resultados consistentes quando confrontado com quantidades de ADN de  $10 \pm 3$  ng/ $\mu$ L.

## 17.12. Validação de tubos de colheita de sangue com EDTA

- 17.12.1. O objetivo deste estudo foi validar os tubos de colheita de sangue com EDTA. Este estudo usou amostras artificiais compostas pelas linhagens celulares de ITD contendo insertos de 21 pb, 126 pb e 279 pb e pela linhagem celular da mutação do TKD em D835 adicionadas a sangue periférico colhido em heparina sódica ou EDTA. As amostras representaram RS mutante:selvagem negativas altas, positivas baixas (perto do limite) e positivas moderadas. O sangue periférico isolado foi usado como amostras negativas verdadeiras.
- 17.12.2. As amostras positivas baixas e positivas moderadas resultaram em 100% de réplicas positivas tanto com EDTA como com heparina sódica. As amostras negativas altas e negativas verdadeiras resultaram em 100% de réplicas negativas tanto com EDTA como com heparina sódica. Portanto, os critérios de aceitação foram cumpridos.
- 17.12.3. Todos os critérios de aceitação da validação foram cumpridos e os tubos de colheita de sangue com EDTA estão validados para utilização com o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

## 17.13. Validação do meio de gradiente de densidade

- 17.13.1. O objetivo deste estudo foi validar a utilização de qualquer meio de gradiente de densidade (com uma densidade de 1,077 g/mL) no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Foram misturadas linhagens celulares (inserto de 21 pb, inserto de 279 pb e TKD D835) com sangue periférico saudável em três frações baixas de células mutantes por linhagem celular (resultando em nove elementos no painel). O sangue periférico saudável também foi testado como amostra negativa para mutações de *FLT3* (resultando em um elemento no painel). Foram isoladas células mononucleares provenientes de duas réplicas usando três fabricantes de meios de gradiente de densidade (MGD) por dois operadores em dois dias, resultando num total de oito réplicas de isolamento por elemento no painel por meio de gradiente de densidade.
- 17.13.2. A percentagem de resultados positivos globais dos dois fabricantes de MGD adicionais (MGD2 e MGD3) foi comparada com a do MGD que foi inicialmente validado para utilização com o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay (MGD1). O MGD1 teve 37,5% de resultados positivos nos 10 elementos do painel. O MGD2 teve 35% e o MGD3 teve 36,3% de resultados positivos, cumprindo assim o requisito de os resultados positivos globais estarem dentro de 10% do MGD1 (2,5% e 1,2%, respetivamente).
- 17.13.3. Todos os critérios de aceitação do estudo foram cumpridos, o que valida a utilização de qualquer meio de gradiente de densidade de 1,077 g/mL no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

## 17.14. Validação do NEBuffer 3.1

- 17.14.1. Este estudo foi concebido para fornecer evidências objetivas de que o NEBuffer 3.1 pode ser usado no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay em vez do NEBuffer 3 e a albumina sérica bovina (bovine serum albumin, BSA). Cinco amostras de ADN positivas para substituição no TKD em D835, 5 positivas para deleção no TKD em I836, uma no

limite de TKD D835 e oito negativas para mutações do TKD foram testadas com um lote de NEBuffer 3 e BSA e três lotes de NEBuffer 3.1. Foram testadas três réplicas por NEBuffer, o que se traduziu num total de 12 réplicas por amostra.

- 17.14.2. Todas as amostras positivas com NEBuffer 3 e BSA também foram positivas com NEBuffer 3.1. Todas as amostras negativas com NEBuffer 3 e BSA foram negativas com o NEBuffer 3.1, gerando um consenso de 100% entre os tipos de NEBuffer. A diferença percentual das razões de sinal entre os tipos de NEBuffer variou entre -4% e 5% para as amostras positivas e no limite. O %CV da razão de sinal para o NEBuffer 3 variou entre 0 e 12,4% e para o NEBuffer 3.1 variou entre 0 e 10,7%.
- 17.14.3. Todos os critérios de aceitação do estudo foram cumpridos, o que valida a utilização do NEBuffer 3.1 no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay.

#### 17.15. Equivalência: NEBuffer r3.1 vs. NEBuffer 3.1

- 17.15.1. O estudo devia fornecer evidências objetivas de que o NEBuffer r3.1 é equivalente ao NEBuffer 3.1 para o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. O NEBuffer (3.1 ou r3.1) é usado com a enzima endonuclease de restrição EcoRV para digerir produtos amplificados do TKD com vista a detetar duas mutações do TKD (D835 e I836) com o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. A única diferença entre o NEBuffer 3.1 e o NEBuffer r3.1 é que a albumina sérica bovina no NEBuffer 3.1 é substituída por uma albumina recombinante no NEBuffer r3.1. O estudo foi concebido para testar 8 amostras de ADN clínicas positivas para mutações do TKD (contendo pelo menos uma amostra com mutação em I836) e 8 amostras de ADN clínicas negativas para mutações do TKD, em triplicado, usando 3 lotes de NEBuffer r3.1 para comparar com 1 lote de NEBuffer 3.1.
- 17.15.2. Houve um consenso de 100% entre NEBuffer r3.1 e 3.1 para todas as amostras. Todas as amostras positivas para mutações do TKD foram corretamente identificadas como positivas e todas as amostras negativas para mutações do TKD foram corretamente identificadas como negativas.
- 17.15.3. O NEBuffer r3.1 foi validado para utilização com o LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay, pois todos os critérios de aceitação foram cumpridos.

#### 17.16. Reprodutibilidade e precisão em múltiplos locais

- 17.16.1. O objetivo deste estudo foi determinar se o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay tinha o desempenho previsto quando testado em três locais diferentes. Foram geradas amostras usando ADN de linhagens celulares com um inserto de 126 pb e um inserto de 279 pb, ADN clínico de mutações do tipo ITD com inserto de 6 pb, inserto de 69 pb e inserto de 193 pb, ADN clínico de TKD com uma substituição no TKD em D835 e uma deleção no TKD em I836, e ADN clínico negativo para mutações de *FLT3*. Todas as amostras clínicas com uma mutação foram testadas em três níveis de razão de sinal: negativa alta, positiva baixa e positiva moderada (resultando em 15 elementos no painel). Dois elementos no painel foram preparados a partir de ADN negativo clínico e as amostras de ADN de linhagens celulares foram testadas em dois níveis de razão de sinal: negativa alta e positiva baixa (resultando em quatro elementos no painel). No total, foram testados 21 elementos no painel por cada local.
- 17.16.2. Dois operadores por local, em dois dias não consecutivos por operador, testaram três réplicas por elemento no painel, alternando entre dois de três lotes do kit por local. Cada local testou um total de 24 réplicas por elemento no painel, totalizando 72 réplicas por elemento no painel para este estudo.
- 17.16.3. O %CV da razão de sinal para elementos no painel positivos (exceto elementos no painel de inserto do tipo ITD longo) variou entre 3,8% e 13,4% para os três locais combinados (Tabela 20) e entre 3,3% e 19,8% para cada local individualmente (menos do que o CV exigido de 25%).

**Tabela 20:** Componentes de variação por elemento no painel (EP) baixo e moderado

Tipo de EP	Nível de RS	N	Média global	Local/ Instrumento		Operador		Dia/Corrida		Lote do kit		Erro aleatório		Variabilidade total	
				DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
ITD de 6 pb pequena	PB	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
	PM	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
ITD de 69 pb média	PB	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
	PM	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
ITD de 126 pb média	PB	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
ITD de	PB	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

**Tabela 20:** Componentes de variação por elemento no painel (EP) baixo e moderado

Tipo de EP	Nível de RS	N	Média global	Local/ Instrumento		Operador		Dia/Corrida		Lote do kit		Erro aleatório		Variabilidade total	
				DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
192 pb longa	PM	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
ITD de 279 pb longa	PB	72	0,073	0,000	0,0	0,010	13,9	0,007	9,6	0,010	13,8	0,018	24,3	0,024	32,6
TKD D835	PB	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
	PM	72	0,164	0,007	4,2	0,001	0,7	0,000	0,0	0,004	2,4	0,021	12,5	0,022	13,4
		71*	0,162	0,004	2,4	0,000	0,0	0,004	2,3	0,000	0,0	0,007	4,3	0,009	5,4
TKD I836	PB	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
	PM	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

\*As medições aberrantes foram removidas: duas de ITD de 69 pb média positivas moderadas e uma de TKD D835 positiva moderada

17.16.4. O limite inferior dos intervalos de confiança bilaterais de 95% de Clopper-Pearson para os consensos percentuais de positivos e negativos (excluindo elementos no painel de inserto do tipo ITD longo) para os três locais combinado foi  $\geq 95,0\%$  e  $90,3\%$ , respectivamente, ultrapassando o critério de 90% exigido.

17.16.5. Todos os critérios de aceitação do estudo foram cumpridos, o que valida uma versão distribuível do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay para utilização por locais adicionais.

#### 17.17. Equivalência de amostras de sangue periférico vs. medula óssea

17.17.1. Pretende-se que o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay detete mutações no ADN genómico (ADNg) isolado a partir de sangue periférico (SP) ou aspirados de medula óssea (MO). Foi realizado um estudo para proporcionar evidências objetivas de que o ADNg isolado a partir de amostras de MO e SP emparelhadas origina resultados concordantes a partir de ambos os tipos de amostras.

17.17.2. As amostras de MO e SP emparelhadas (provenientes do mesmo indivíduo e com mesma data de colheita) foram colhidas prospetivamente a partir de centros de colheita clínica para auxiliar estudos de validação analítica. Também foram colhidas amostras emparelhadas como parte do estudo Astellas 2215-CL-0301. O conjunto de amostras era composto por 95 pares: 62 provenientes de centros de colheita clínicos e 33 provenientes do estudo Astellas 2215-CL-0301. O consenso médio de positivos (CMP) e o consenso percentual médio de negativos (CMN) foram calculados usando o consenso percentual de positivos (CPP) e o consenso percentual de negativos (CPN) com ponderação dos totais marginais correspondentes. Adicionalmente, os intervalos de confiança de 95% para a CMP e a CMN foram calculados usando o método de percentis de bootstrapping não paramétrico.

17.17.3. A Tabela 21 mostra a tabela de concordâncias entre os resultados de SP e MO relativamente ao estado mutacional de *FLT3*. Conforme mostrado na tabela abaixo, 94 dos 95 doentes apresentaram concordância entre SP e MO e apenas um par gerou um resultado discordante. Este resultado esteve associado a um resultado de amostra de MO no limite clínico (RS = 0,05).

**Tabela 21:** Concordância entre sangue periférico e medula óssea — estado mutacional de *FLT3* global

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

- 17.17.4. A Tabela 22 mostra o consenso entre MO e SP usando MO e SP como referência. As estimativas pontuais de CPN, CPP e concordância percentual global (CPG) estiveram todas acima de 97%. O limite inferior do intervalo de confiança de 95% da CPG esteve acima de 94%, demonstrando o consenso entre os tipos de amostra SP e MO.

**Tabela 22:** Consenso entre sangue periférico e medula óssea — estado mutacional de *FLT3* global

Consenso	Consenso percentual (N)	IC de 95% <sup>(1)</sup>
CPP MO	97,2% (35 / 36)	(85,5%, 99,9%)
CCP 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%)

<sup>(1)</sup>O IC de 95% é calculado usando o método exato (de Clopper-Pearson).

- 17.17.5. A Tabela 23 mostra o consenso percentual médio de positivos (CMP) e o consenso percentual médio de negativos (CMN) entre os resultados do teste de diagnóstico complementar obtidos em sangue periférico e medula óssea. O CMP (CMN) foi calculado como a média ponderada do CPP (CPN) usando SP como referência e o CPP (CPN) usando MO como referência. As estimativas pontuais de CMP e CMN são de 98,6% e 99,2%. Os limites inferiores dos intervalos de confiança de 95% estão acima de 95% para o CMP e o CMN, demonstrando o consenso entre resultados para SP e MO.

**Tabela 23:** Consenso médio entre sangue periférico e medula óssea — estado mutacional de *FLT3* global

Medida de consenso	Consenso percentual	IC de 95% <sup>(1)</sup>
CMP	98,6%	(95,1%, 100,0%)
CMN	99,2%	(97,2%, 100,0%)

<sup>(1)</sup>O IC de 95% foi calculado usando um método de bootstrapping não paramétrico (N = 1000)

- 17.17.6. O consenso entre sangue periférico e medula óssea relativamente ao estado mutacional de *FLT3* é elevado, indicando que ambos os tipos de amostra são apropriados para utilização com o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. Estão disponíveis análises detalhadas do consenso entre sangue periférico e medula óssea para ITD e TKD no Resumo da segurança e do desempenho (280544).

## 18. Avaliação do desempenho clínico

### 18.1. Estudo clínico IVS-056-001 (ensaio clínico ADMIRAL)

#### 18.1.1. Visão geral do estudo (IVS-056-001)

- 18.1.1.1. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay foi desenvolvido pela Invivoscribe (IVS) e está aprovado pela FDA como teste de diagnóstico complementar a ser usado como auxiliar na avaliação da leucemia mieloide aguda (LMA). Com vista a demonstrar a utilidade clínica do teste de diagnóstico complementar (Companion Diagnostic, CDx), os doentes forneceram consentimento informado para que a respetiva amostra fosse testada com o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay para a inscrição num estudo clínico decisivo (estudo de fase III 2215-CL-0301 que avalia a eficácia de ASP2215). Os dois tipos de mutações no gene *FLT3* detetadas pelo teste *FLT3* CDx são a duplicação interna em tandem (internal tandem duplication, ITD) e mutações do domínio de tirosina cinase (tyrosine kinase domain, TKD).

- 18.1.1.2. Para avaliar a exatidão do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay, um método de sequenciação de próxima geração que utiliza a plataforma MiSeq da Illumina serviu como fonte independente de informações de sequenciação para as mutações do tipo ITD e do TKD. A testagem com o método de referência foi desenvolvida e validada pela Invivoscribe para a capacidade de avaliar a presença ou ausência de mutações do tipo ITD ou do TKD de *FLT3*. O ensaio foi então avaliado para determinar a exatidão do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay usando ADN extraído de amostras biológicas colhidas durante a seleção e inscrição do estudo 2215-CL-0301.

#### 18.1.2. Objetivos do estudo (IVS-056-001)



- 18.1.2.1. Na análise final, o objetivo coprimário do estudo foi estimar a eficácia do fumarato de gilteritinib na população com resultado positivo no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay através da aplicação de um teste log-rank estratificado sobre a sobrevivência global.
- 18.1.2.2. O objetivo do estudo do método de referência é determinar de forma independente a presença ou ausência de mutações de *FLT3* usando a plataforma de sequenciação de próxima geração MiSeq da Illumina para confirmar a exatidão do LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. O objetivo deste estudo é descrito na secção do objetivo secundário do protocolo, estudo decisivo do LeukoStrat *FLT3* Mutation Assay CDx para o composto ASP2215.
- 18.1.3. População de doentes (IVS-056-001)
  - 18.1.3.1. Na análise final, 771 amostras provenientes de 633 indivíduos foram rastreadas com o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay. 371 indivíduos foram incluídos no conjunto “intenção curativa” (Intent to Treat, ITT). Cinco indivíduos que obtiveram um resultado negativo no LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay e foram inscritos com base na testagem local de *FLT3* foram excluídos do “conjunto de análise total” (Full Analysis Set, FAS). Portanto, foram aleatorizados 366 indivíduos no FAS para a análise final.
- 18.1.4. Seleção de amostras para testagem com o método de referência (IVS-056-001)
  - 18.1.4.1. Foi selecionada para testagem com o método de referência uma amostra por indivíduo. As amostras com volume insuficiente para testagem com o método de referência foram excluídas do estudo. No total, foram testadas 467 amostras com o método de referência.
- 18.1.5. Análise de segurança (IVS-056-001)
  - 18.1.5.1. Não se prevê que o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay cause diretamente efeitos adversos efetivos ou potenciais, mas os resultados dos testes poderão ter um impacto direto nos riscos dos tratamentos dos doentes.
- 18.1.6. Eficácia (IVS-056-001)
  - 18.1.6.1. Na análise final, a sobrevivência global (overall survival, OS) mediana no braço de fumarato de gilteritinib foi mais longa (9,3 meses) em comparação com aquela no braço de quimioterapia de resgate (5,6 meses) na população com resultado positivo no teste de diagnóstico complementar. A razão de risco (hazard ratio, HR) estratificada por regressão de Cox foi calculada como sendo de 0,637 (IC de 95% 0,488, 0,830) relativamente à quimioterapia de resgate, valor de p (unilateral, log-rank estratificado) = 0,0004, correspondendo a uma redução do risco relativo de morte a favor de fumarato de gilteritinib. A curva de Kaplan-Meier é fornecida na Figura 10.

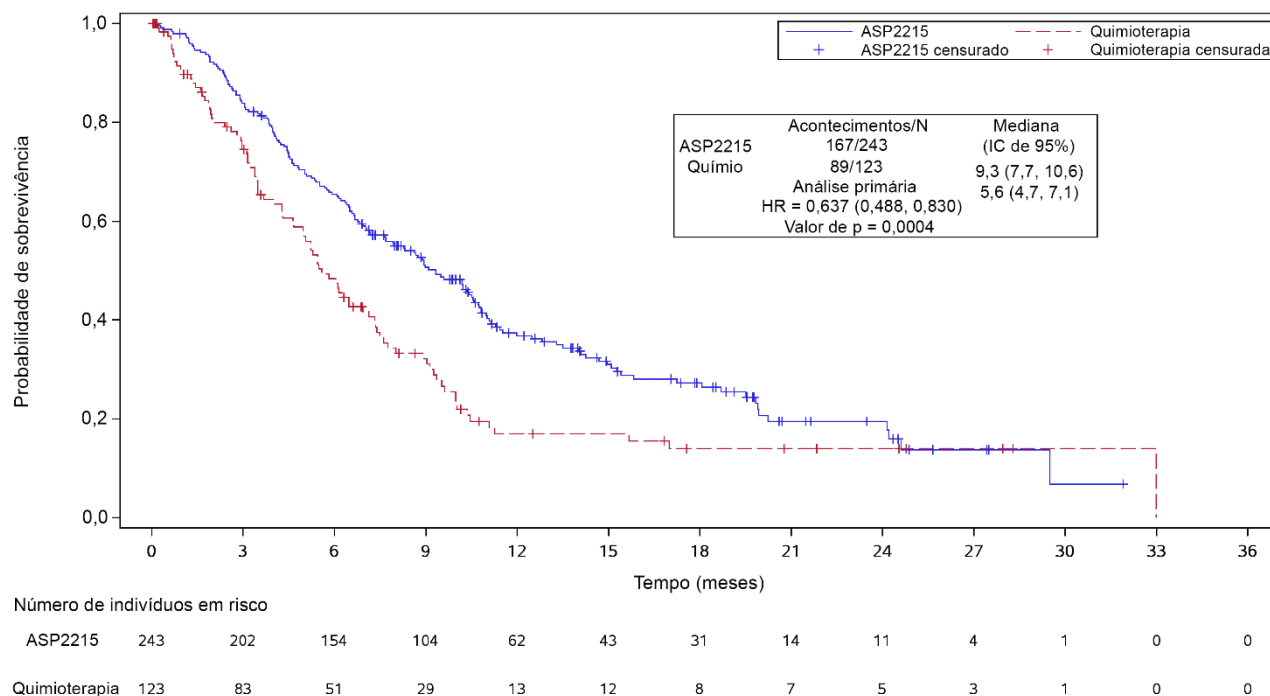


Figura 10 - Curva de Kaplan-Meier da sobrevivência global.



- 18.1.6.2. O LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay demonstrou consenso com o método de referência. O consenso global foi elevado (97,2%). O limite inferior do intervalo de confiança de 95% do CPG está acima de 90%, demonstrando o consenso entre o *FLT3* Mutation CDx e o ensaio MiSeq Sequencing.

**Tabela 24:** Consenso entre o CDx e a sequenciação com MiSeq

Consenso	Consenso percentual (N)	IC de 95% <sup>(1)</sup>
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%)

<sup>(1)</sup>O IC de 95% é calculado usando o método exato (de Clopper-Pearson).

As estimativas pontuais do CPP, CPN e CPG para ITD são 100%, 92,8% e 97%, respectivamente. As estimativas pontuais do CPP, CPN e CPG para TKD são 100%, 99,3% e 99,4%, respectivamente.

**Tabela 25:** Tabela de contingência entre o ITD CDx e a sequenciação com MiSeq

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

**Tabela 26:** Tabela de contingência entre o TKD CDx e a sequenciação com MiSeq

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

- 18.1.6.3. Usando os dados de consenso acima (Tabela 24), o desempenho clínico do dispositivo foi determinado conforme listado na Tabela 27.

**Tabela 27:** Desempenho clínico

Medida do desempenho clínico	Desempenho calculado
Sensibilidade diagnóstica	$\frac{300}{300 + 0} = 1$
Especificidade diagnóstica	$\frac{150}{150 + 13} = 0,92$
Razão de probabilidade de positivo	$\frac{1}{1 - 0,92} = 12,5$
Razão de probabilidade de negativo	$\frac{1 - 1}{0,92} = 0$

#### 18.1.7. Conclusões (IVS-056-001)

- 18.1.7.1. Na análise final, 366 indivíduos foram incluídos no conjunto de análise completo. A OS mediana no braço de fumarato de gilteritinib foi mais longa (9,3 meses) em comparação com aquela no braço de quimioterapia de resgate (5,6 meses) na população com resultado positivo no teste de diagnóstico complementar. A razão de risco (hazard ratio, HR) estratificada por regressão de Cox foi calculada como sendo de 0,637 (IC de 95% 0,488, 0,830) relativamente à quimioterapia de resgate, valor de p (unilateral,

log-rank estratificado) = 0,0004, correspondendo a uma redução do risco relativo de morte a favor de fumarato de gilteritinib.

- 18.1.7.2. Para a testagem do método de referência, o critério de aceitação do estudo foi cumprido: o limite inferior do intervalo de confiança de 95% bilateral exato (de Clopper-Pearson) do consenso percentual global (CPG) ultrapassou 90%. Foi possível estabelecer o consenso entre o LeukoStrat CDx *FLT3* Mutation Assay e o método de referência de sequenciação de próxima geração MiSeq.

## 19. Bibliografia

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 Resumo da segurança e do desempenho — LeukoStrat® CDx *FLT3* Mutation Assay. [www.eudamed.eu/](http://www.eudamed.eu/).

## 20. Assistência Técnica e Apoio ao Cliente

### Informações para contacto



Invivoscribe, Inc

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





















Telefone: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horário laboral: 07:00 - 17:00 PST/PDT

Apoio técnico: [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com) | Apoio ao cliente: [sales@invivoscribe.com](mailto:sales@invivoscribe.com) | Website: [www.invivoscribe.com](http://www.invivoscribe.com)

Os Representantes de Assistência Técnica e Apoio ao Cliente estão disponíveis de segunda a sexta-feira para esclarecer dúvidas através de contacto telefónico, por e-mail ou no website.

## 21. Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados na rotulagem dos produtos de diagnóstico da Invivoscribe:

	Para diagnóstico in vitro		Marcação CE
	Referência do catálogo		Data de validade
	Volume de reagente		Representante autorizado na União Europeia
	Número de lote		Fabricante
	Condições de conservação		Data de fabrico
	Consulte as Instruções de utilização		ADN polimerase Taq
	Controlo positivo		Enzima EcoRV
	Controlo sem molde		NEBuffer r3.1
	Controlo da extração		Master Mix
	Revisão		Identificador único do dispositivo

## 22. Aviso legal

Este produto destina-se a diagnóstico *in vitro*.

Muitos destes produtos podem exigir métodos de amplificação de ácidos nucleicos, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Nenhuma licença ao abrigo das referidas patentes para utilização de processos de amplificação ou enzimas é transmitida expressa ou implicitamente ao comprador mediante a compra deste produto.

©2023 Invivoscribe, Inc. Todos os direitos reservados. As marcas comerciais mencionadas neste documento são propriedade da Invivoscribe Technologies, Inc. e/ou das suas afiliadas, ou (relativamente às marcas registadas de terceiros utilizadas neste documento) dos seus respetivos proprietários.

## 23. Histórico de revisões

**Tabela 28:** Histórico de revisões das instruções de utilização

Revisão	Data de edição	Alteração
A	Julho de 2023	Publicação inicial
B	Dezembro de 2023	Os requisitos de sistema de software atualizados são aplicáveis à versão 1.1.3.IVD. Versão DCS corrigida na Tabela 2. "LeukoStrat CDx <i>FLT3</i> Software" atualizado para o nome completo nas IFUs do PFIGS. Removido como alterar as instruções de localidade do sistema operacional para o software v1.1.2.IVD.