



Instrucciones de uso

FLT3-TKD2 dPCR OncoKit

Ref. IMG-405



Fabricado por:

HEALTH IN CODE, S.L

Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia, 46024, España
+34 963 212 340 - info@healthincode.com

healthincode.com

Código: HIC-PT-KIT 03-F-03 V.01

healthincode

Health in Code S.L. le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Este producto está diseñado para su uso en investigación (RUO, *Research Use Only*).

Health in Code S.L. no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Health in Code S.L., respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Health in Code S.L. no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Health in Code S.L. son sometidos a un riguroso control de calidad. El producto **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con el Departamento Técnico:



+34 963 212 340



tech.support@healthincode.com

índice

01	Información General	4
02	Uso previsto	6
03	Características técnicas	7
04	Advertencias y precauciones de seguridad	8
05	Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	9
06	Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran	10
07	Protocolo de ensayo	12
	07.1 Preparación de los reactivos	12
	07.2 Preparación de las reacciones de amplificación	12
	07.3 Configuración del programa de la PCR digital	13
08	Análisis de los resultados	14
09	Troubleshooting	17
10	Limitaciones	18
	10.1 Analíticas	18
	10.2 Equipos	18
	10.3 Reactivos	18
	10.4 Estabilidad del Producto	18
11	Características de rendimiento	19
	11.1 Muestras de validación	19
	11.2 Límite de blanco (LOB) y límite de detección (LOD)	19
	11.3 Límite de cuantificación (LOQ)	19
	11.4 Especificidad	20
	11.5 Repetibilidad y reproducibilidad	20
	11.6 Sensibilidad con muestras clínicas	21

01 Información general

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia caracterizada por la proliferación anormal de células mieloides de origen clonal que infiltran la médula ósea, la sangre periférica y otros tejidos. La acumulación de estas células que se encuentran en distintos estados de maduración incompleta debido a fallos en la diferenciación desplaza a los elementos hematopoyéticos sanos, lo que causa insuficiencia medular e infiltración extramedular en el bazo, el hígado, la piel, las encías y el sistema nervioso central.

La heterogeneidad inmunológica, citogenética y molecular de los pacientes adultos menores de 60 años con leucemia mieloide aguda se relaciona con la variabilidad en la respuesta al tratamiento que tienen los pacientes y repercute en la supervivencia global y libre de enfermedad. En los países occidentales representa: el 80 % de las leucemias aguda en adultos y el 15-20 % en niños menores de 15 años, con mayor frecuencia en neonatos.

Las mutaciones en el gen *FLT3* están fuertemente asociadas con un mal pronóstico y un alto recuento de células leucémicas en pacientes con LMA, lo que sugiere que están involucradas en la progresión de la enfermedad. Se ha visto que entre un 15-35% de los pacientes con LMA tienen mutaciones en dicho gen, por lo que la detección y análisis de estas mutaciones es relevante a la hora de hacer el diagnóstico y seguimiento.

La mutación más frecuente es la duplicación interna en tándem (ITD) en la región que codifica el dominio yuxtamembrana. La longitud de la duplicación varía entre 3-400 pb y se produce frecuentemente en el exón 14, aunque a veces también incluye una porción del exón 15.

Otra de las mutaciones descritas en el gen *FLT3* es una mutación puntual en el exón 20 del segundo dominio de tirosina kinasa (DTK2). La más frecuente es la p.D835Y en la cual se produce la sustitución de G > T (GAT > TAT) en el codón 835 y, por tanto, la sustitución del ácido aspártico por tirosina. Existen otras mutaciones menos comunes, como deleciones en el mismo codón 835 o deleciones e inserciones en codones próximos al 835, como la p.I836. La mayoría de los pacientes presentan un solo tipo de mutación (ITD o p.D835), pero ocasionalmente se han encontrado en un mismo paciente ambas mutaciones.

La presencia de mutaciones en *FLT3-TKD2* en pacientes con LMA tratados con inhibidores *FLT3* (i*FLT3*) se ha asociado con la aparición de resistencia al tratamiento. Por lo tanto, analizar la presencia de estas mutaciones en el paciente permitiría individualizar el tratamiento con inhibidores *FLT3* evitando la aparición de resistencias.

Actualmente, en España están aprobados por la EMA (*European Medicines Agency*) y por la AEMPS (Agencia española de medicamentos y productos sanitarios) los tratamientos *Sorafenib*, *Midostaurina* y *Gilteritinib*.

Referencias

- > Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodaera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2434–9. doi: 10.1182/blood.v97.8.2434. PMID: 11290608.
- > De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*. 2016 Jul 1;6(7):e441. doi: 10.1038/bcj.2016.50. PMID: 27367478; PMCID: PMC5030376.
- > Kottaridís PD, Rosemary EG, Gale SE, et al. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 2002
- > Liang DC, Shih LY, Hung IJ, Yang CP, Chen SH, Jaing TH, Liu HC, Wang LY, Chang WH. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003 May;17(5):883–6. doi: 10.1038/sj.leu.2402928. PMID: 12750701.
- > Kiyoi H, Naoe T. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia. *Methods Mol Med*. 2006;125:189–97. doi: 10.1385/1-59745-017-0:189. PMID: 16502586.
- > Quintero SY, Hernández PC, Concepción FY. Acute myeloid leukemia: prognostic influence of some biomarkers and the therapeutic response in patients under 60 years of age. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2021;37(3):1–23.
- > Capelli D, Menotti D, Fiorentini A, Saraceni F, Olivieri A. Overcoming Resistance: FLT3 Inhibitors Past, Present, Future and the Challenge of Cure. *Cancers (Basel)*. 2022 Sep 2;14(17):4315. doi: 10.3390/cancers14174315. PMID: 36077850; PMCID: PMC9454516.
- > <https://www.aemps.gob.es/>
- > <https://www.ema.europa.eu/en>
- > Staudt D, Murray HC, McLachlan T, Alvaro F, Enjeti AK, Verrills NM, Dun MD. Targeting Oncogenic Signaling in Mutant FLT3 Acute Myeloid Leukemia: The Path to Least Resistance. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct 16;19(10):3198. doi: 10.3390/ijms19103198. PMID: 30332834; PMCID: PMC6214138.
- > Lam SSY, Leung AYH. Overcoming Resistance to FLT3 Inhibitors in the Treatment of FLT3-Mutated AML. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 24; 21(4): 1537. doi: 10.3390/ijms21041537. PMID: 32102366; PMCID: PMC7073218.

02 Uso previsto

El kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** está dirigido a la detección y cuantificación de las variantes en los codones 835 y 836 del segundo dominio de la tirosina quinasa del gen *FLT3* a partir de muestras de ADN genómico mediante la tecnología de PCR digital (dPCR). El kit emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un ensayo multiplexado no-competitivo que permite la cuantificación del alelo alternativo.

El kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** está indicado para su uso en investigación y está estrictamente dirigido a personal técnico de la salud y profesionales del sector de la biología molecular que necesiten obtener una cuantificación rigurosa de las variantes p.D835 y p.I836 en *FLT3*.

03 Características técnicas

El kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** está diseñado para el análisis de ADN genómico (ADNg) total extraído a partir de muestras de sangre periférica.

Para la validación del kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** se ha diseñado ADN sintético-independientes que contienen los alelos mutado y *wild-type*. La detección y cuantificación de ambos alelos permite calcular la frecuencia de la variante de interés (VAF, *variant allele frequency*) en la muestra. Además, se ha utilizado la muestra de referencia *FLT3 D835Y Reference Standard*, 50% de *Horizon Discovery* (código ID: HD668) que contienen la variante p.D835Y. Asimismo, se analizaron muestras positivas de ADNg de pacientes previamente genotipadas por secuenciación masiva (NGS).

La validación completa proporciona un método de diagnóstico robusto que permite establecer las siguientes **especificaciones técnicas**:

- ◇ **Tipo de muestra:** ADN genómico procedente de sangre periférica
- ◇ **Control positivo:** ADN sintético con la variante p.D835Y de *FLT3* en heterocigosis
- ◇ **Cantidad de ADN recomendado:** 65 ng
- ◇ **Límite de detección:** 0,2% ± 5,4E-4
- ◇ **Límite de cuantificación:** 0,5%
- ◇ **Número de reacciones por muestra:** 1
- ◇ **Número de dianas:** 2 (alelo alternativo y alelo *wild-type* invariable de *FLT3*)
- ◇ **Duración del programa de dPCR:** 1 h 45 min.

El kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** es compatible con la plataforma *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System* (Thermo Fisher Scientific) con canales de fluorescencia FAM™ y VIC™. Este dispositivo incorpora el programa *QuantStudio Absolute Q Digital PCR Software CT* para llevar a cabo un análisis semiautomático de los resultados.

04 Advertencias y precauciones

- ◇ Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
- ◇ No pipetear con la boca.
- ◇ No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
- ◇ Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
- ◇ No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
- ◇ En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
- ◇ Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
- ◇ Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
- ◇ Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
- ◇ Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
- ◇ El fabricante no responde frente al mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por Health in Code S.L.
- ◇ El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por Health in Code S.L. por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.

05 Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

El kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** está compuesto por los siguientes reactivos:

- ➔ **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit Master Mix**, que contiene:
 - ◇ oligonucleótidos específicos
 - ◇ sondas producidas por Applied Biosystems™ marcadas en FAM™ y VIC™ para la detección de los alelos *wild-type* y alternativo de las variantes en los codones 835 y 836 del dominio TKD2 del gen *FLT3*
 - ◇ agua libre de nucleasas.
- ➔ **Control positivo**: contiene ADN sintético con la variante p.D835Y en heterocigosis.

Este kit contiene reactivos desecados para llevar a cabo 24 reacciones de PCR digital. En la Tabla 1 se indican las características físicas, cantidades y condiciones de conservación.

Reactivos	Color del soporte	Cantidad	Conservación
FLT3-TKD2 dPCR OncoKit Master Mix	Disco morado	2 X 12 rxn	4°C
Control positivo	Tapón morado	6 rxn	4°C

Tabla 1. Componentes del kit *FLT3-TKD2 dPCR OncoKit*.

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Micropipetas de 10 µL, 20 µL y 200 µL
- *Vortex*
- Centrifuga
- *QuantStudio Absolute Q Digital PCR* (ThermoFisher Scientific)

Reactivos:

- Agua libre de nucleasas
- *Etanol absolute*
- *Absolute Q DNA Digital PCR Master Mix* (Ref. A52490)
- *Isolation Buffer* (Ref. A52730)

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL y 200 µL)
- Tubos estériles de 1,5 mL
- Guantes de látex sin polvo
- *MAP16 Plate Kit* (Ref. A52865)

Kits complementarios

Para el análisis de las dianas relacionadas con el estudio de patologías hematológicas, Health in Code S.L. también ofrece los siguientes kits de PCR a tiempo real:

- ↘ *Imegen® BCR ABL1 Screening* (ref. IMG-108)
- ↘ *Imegen® m-BCR ABL* (ref. IMG-121)
- ↘ *Imegen® M-BCR ABL* (ref. IMG-122)
- ↘ *Imegen® Inv16* (ref. IMG-109)
- ↘ *Imegen® PML-RARA Screening* (ref. IMG-130)
- ↘ *Imegen® PML-RARA* (ref. IMG-111)
- ↘ *Imegen® NPM1* (ref. IMG-235)
- ↘ *Imegen® MPL* (ref. IMG-236)

Mediante análisis de fragmentos:

- ↳ Imegen® FLT3 (ref. IMG-238)
- ↳ Imegen® CALR (ref. IMG-237)

Mediante análisis de PCR digital (dPCR):

- ↳ cKIT dPCR OncoKit (ref. IMG-407)

Mediante secuenciación masiva (NGS, *next-generation sequencing*):

- ↳ Haematology OncoKitDx (ref. IMG-363)

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de los reactivos de PCR digital

El primer paso antes de aplicar el protocolo será rehidratar los reactivos desecados:

- ➔ **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit Master Mix:** añadir 20 µl de agua libre de nucleasas a cada vial.
- ➔ **Control positivo:** añadir 50 µl de agua libre de nucleasas en el vial.

NOTA: se recomienda conservar los reactivos una vez rehidratados a - 20°C.

07.2 | Preparación de las reacciones de amplificación

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Se recomienda realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo, se recomienda preparar una reacción de amplificación por muestra e incluir el control positivo y un control negativo de PCR para descartar posible contaminación de los reactivos.

A continuación, se especifica el protocolo para la preparación de las reacciones de amplificación:

- 01 Descongelar todos los reactivos del kit, el agua libre de nucleasas y el ADN de las muestras.
- 02 Agitar y centrifugar cada reactivo y mantener en hielo.
- 03 Añadir los siguientes reactivos en un tubo de 1,5 mL:

Reactivo	Volumen por reacción
FLT3-TKD2 dPCR OncoKit Master Mix	1,5 µL
Absolute Q DNA Digital PCR Master Mix (5x)*	2 µL

(*) Reactivo no suministrado por el fabricante (ver sección "06. Equipos, reactivos y materiales no suministrados").

- 04 Mezclar el *mix* de PCR pipeteando arriba y abajo con cuidado para no generar burbujas y dispensar 3,5 µL en los tubos de 0.2 mL correspondientes.

- 05 Añadir 6,5 µL de la muestra de ADN a 10 ng/µL o de agua libre de nucleasas (control negativo de PCR) a los tubos correspondientes.
- 06 En un ángulo de 45°, cargar 9 µL de los reactivos de PCR en el fondo del pocillo de la placa *microfluidic array plate MAP16*. Pipetear la mezcla hasta el primer tope de la pipeta.
- 07 A continuación, en un ángulo de 45°, cargar 15 µL del *Isolation Buffer* contra el lateral del pocillo dejándolo caer sobre los reactivos para evitar que se mezclen y formen burbujas.

07.3 | Configuración del programa de PCR digital

↘ Carga de la *microfluidic array plate (MAP16)*

Ensamblar las tiras de la placa MAP17 en las 4 columnas de pocillos. Asegúrese de cubrir las columnas por completo y coloque las tapas de la placa MAP en todas las columnas, incluidas las columnas no utilizadas. Descargue la guía de usuario: *MAN0025621 QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System User Guide* disponible en su sitio web www.thermofisher.com, y siga las instrucciones del Capítulo 2.

↘ Configuración del programa de PCR

Colocar la placa MAP en el *QuantStudio™ Absolute Q™ System*, seleccionar el protocolo de la lista y modificar los canales óptimos y los parámetros de PCR según se especifica en las Tablas 2 y 3.

Fluoróforo	Diana molecular	Análisis
FAM™	codones 835 y 836 de <i>FLT3</i>	señal
VIC™	<i>FLT3</i> endógeno	señal
ROX	QC	QC

Tabla 2. Configuración de los canales para la detección de los fluoróforos en el *QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR System*. QC: quality control.

Etapa	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	96°C	10 minutos
PCR	45	96°C	10 segundos
Desnaturalización, anillamiento y extensión		56°C	15 segundos

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para el *QuantStudio Absolute Q dPCR (Thermo Scientific)*.

↘ Lectura de los *arrays* y obtención de resultados

Una vez completada la ejecución de la PCR, siga las instrucciones de la Guía del usuario del sistema de PCR digital *QuantStudio™ Absolute Q™* disponible en el sitio web www.thermofisher.com.

08 Análisis de resultados

Para el análisis de resultados es importante conocer el marcaje de las sondas que detectan cada una de las dos dianas analizadas en el kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit**. En la Tabla 4 se indican las especificaciones de cada una.

Sistema	Fluoróforo	Función	Quencher
FLT3-TKD2 dPCR OncoKit Master Mix	FAM™	La sonda FAM™ es alelo-específica para los codones 835 y 836 de <i>FLT3</i> .	MGB
	VIC™	La sonda VIC™ se une a una región del gen <i>FLT3</i> no mutado que se espera invariable. Se utiliza como control endógeno.	MGB

Tabla 4. Información de las sondas de análisis. WT: wild-type.

El enfoque utilizado en el diseño del kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** se basa en un ensayo multiplexado de dPCR no-competitivo. El análisis de las muestras se realiza con el software específico del termociclador de PCR utilizado: *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR Software*. Este programa permite visualizar los datos en un gráfico bidimensional (2D) o de nubes.

Al establecer el umbral para dos dianas en los gráficos 2D, se pueden identificar hasta tres grupos o nubes (Figura 1):

- ◇ La nube de puntos negros representa particiones donde no ha habido amplificación y, por tanto, no se ha registrado señal para ninguna sonda
- ◇ La nube de puntos naranja corresponde a particiones únicamente positivas para la sonda VIC™ que hibrida en una región del gen *FLT3* invariable y que se utiliza como control endógeno.
- ◇ La nube de puntos verde que corresponde a particiones positivas en las que se ha registrado señal para ambas sondas FAM™ y VIC™ (grupo combinado).

Debido a la estrategia de diseño utilizada, no existe la posibilidad de que se genere una cuarta nube en el cuadrante superior izquierdo del gráfico 2D. Esto es debido a que la sonda en FAM™ está diseñada para unirse al alelo *wild-type* de los codones diana. Al mismo tiempo, siempre tendremos amplificación de la sonda VIC™ que hibrida en una región no mutada del gen *FLT3*. Por lo tanto, en el caso de que no haya mutación, siempre se obtendrá la máxima señal de FAM™ y VIC™, ya que ambas se unen a alelos *wild-type*, produciendo únicamente la nube verde o grupo combinado (Figura 1A).

Por el contrario, cuando el alelo mutado esté presente, se producirá una disminución de la señal de FAM™, por lo que aparecerán particiones donde únicamente haya amplificado el

endógeno de *FLT3* en VIC™ asociada a la nube naranja (Figura 1 B-D). La Tabla 5 resume la interpretación de estos resultados.

Interpretación de resultados			
Muestra	Nube FAM™	Nube VIC™	Nube combinada FAM™ + VIC™
<i>Wild-type</i> FLT3-TKD2	-	-	+
Mutación FLT3-TKD2	-	+	+

Tabla 5. Posibles resultados al cargar una muestra de gDNA, siendo + y - la presencia o ausencia de nubes o clusters.

A partir de los gráficos obtenidos, el software de análisis informa los resultados en copias por microlitro (cp/μL) en base a la concentración de las dianas que contiene la reacción de dPCR. Con estos datos, se procede a la cuantificación de las mutaciones en los codones 835/836 (%) expresada como una medida relativa de la diferencia del número de cp/μL detectado para los dos alelos *wild-type* respecto al número de cp/μL del gen *FLT3*, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% FLT3mut = \frac{(VIC - FAM)}{VIC} \times 100$$

Donde:

- **FAM:** son las copias/μL para FAM reportadas por el programa de análisis (región alelo específica para los codones 835-836 del gen *FLT3*).
- **VIC:** son las copias/μL para VIC reportadas por el programa de análisis (región endógena inalterada del gen *FLT3*).

Para que el ensayo pueda considerarse válido, el usuario debe asegurarse de que se cumplen las siguientes condiciones:

- ◇ No hay señal de amplificación del control negativo de PCR, ni en el canal FAM™ ni en el canal VIC™.
- ◇ Hay señal para los dos canales (FAM™ y VIC™) en la reacción con el control positivo con un valor de cuantificación del 50% (±10%).
- ◇ En el caso de obtener resultados diferentes a los expuestos en este apartado, consultar la sección "09. Troubleshooting" de este manual.

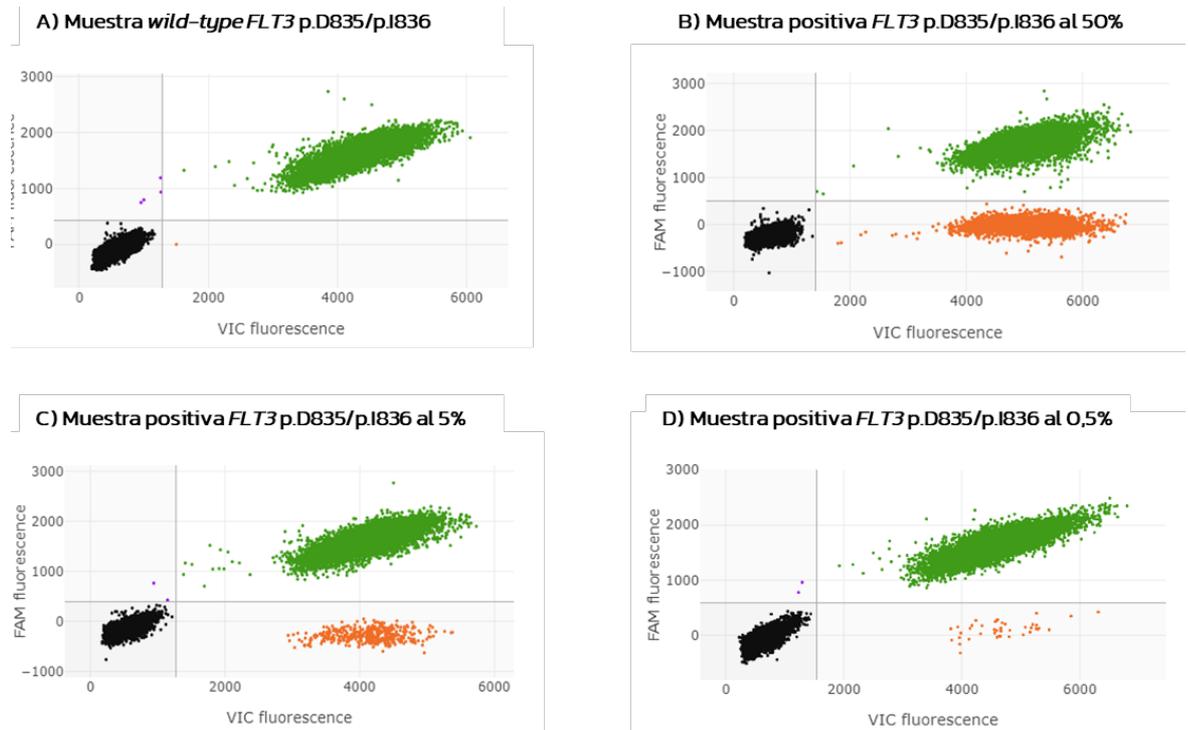


Figura 1. Gráficos bidimensionales (2D) obtenidos con el kit FLT3-TKD2 dPCR OncoKit donde se muestran los diferentes resultados posibles. A) Se observa la nube verde esperada en una muestra sin mutaciones en FLT3. La nube corresponde a las señales combinadas de los canales FAM™ y VIC™ que amplifican la región invariable de FLT3 y el alelo wild-type de los codones 835/836. B-D) Gráficos correspondientes a muestras positivas para mutaciones en los codones 835/836 de FLT3. A medida que disminuye la frecuencia de la variante en la muestra, también lo hace la nube naranja asociada a la amplificación única de la región de FLT3 wild-type endógena. En todos los casos, la nube de puntos negra representa particiones donde no se ha producido amplificación.

09 Troubleshooting

En la Tabla 6 se especifican los resultados esperados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles y una muestra en un ensayo, así como su interpretación:

Control	Resultado 2D Scatter Plot			Causa
	FAM™	VIC™	FAM™ + VIC™	
Control positivo	-	+	+	Resultado esperado
	-	-	-	Fallo de amplificación en la PCR ¹
Muestra	-	+	+	Resultado esperado
	-	-	+	
	+	-	-	Resultado no válido ⁴
	-	-	-	Fallo de amplificación en la PCR ²
Control Negativo de PCR	-	-	-	Resultado esperado
	+	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano ³
	+	-	-	
	-	+	-	
	-	-	+	

Tabla 6. Interpretación de los posibles resultados, siendo + (presencia) y - (ausencia) de nubes o clusters en la gráfica 2D.

(1) Fallo de amplificación en la PCR: Compruebe el programa de amplificación y la configuración de captura de la fluorescencia. Un fallo en la amplificación puede deberse a un problema técnico en la configuración del programa de PCR.

(2) Fallo de amplificación de la muestra: Compruebe que la cuantificación de la muestra es la recomendada, si fuese así el resultado especificado puede deberse a que la muestra se encuentre altamente degradada.

(3) Contaminación de la PCR con ADN de humano: La contaminación de la PCR puede deberse a un manejo equivocado de la muestra, al uso de reactivos contaminados o a contaminación de origen ambiental. Limpie minuciosamente el laboratorio donde se ha preparado la PCR, así como los equipos y el material utilizados. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR. Prepare en último lugar la reacción de PCR que contiene el control positivo, con el fin de evitar la contaminación cruzada. En este caso se recomienda repetir el ensayo.

(4) Resultado no válido: No hay amplificación de VIC (control endógeno), por lo que es necesario repetir en ensayo.

10 Limitaciones

10.1 | Analíticas

El kit FLT3-TKD2 dPCR OncoKit identifica y cuantifica las variantes patogénicas en los codones p.D835/p.I836 del gen *FLT3* pero no es capaz de discernir entre ambas. Para ello, sería necesario el uso de otra técnica molecular.

El kit FLT3-TKD2 dPCR OncoKit también detecta la variante R834Q, no asociada a la resistencia a inhibidores de *FLT3*.

10.2 | Equipos

El kit FLT3-TKD2 dPCR OncoKit ha sido validado usando la plataforma de amplificación:

➤ *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System* (Thermo Fisher Scientific)

10.3 | Reactivos

El kit FLT3-TKD2 dPCR OncoKit se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual (Equipos y materiales necesarios que no se suministran).

10.4 | Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas por el fabricante de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.

11 Características del rendimiento

11.1 | Muestras de validación

El kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** está diseñado para el análisis de ADN genómico (ADNg) total extraído a partir de muestras de sangre periférica.

Para la validación analítica del kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** se han utilizado diferentes tipos de muestras:

- ◇ ADN sintéticos independientes que contienen los alelos alternativos p.R834Q/p.D835Y/p.M837I y *wild-type*
- ◇ 23 muestras clínicas que comprenden 21 muestras positivas para variantes en el codón 835 (p.D835Y/H/E/A/N/V) y 2 para el cambio más recurrente en el codón 836 (p.I836del)
- ◇ La muestra de referencia *FLT3 D835Y Reference Standard*, 50% de *Horizon Discovery* (Código ID: HD668).
- ◇ 16 muestras negativas para la mutación de interés.

11.2 | Límite de blanco (LOB) y detección (LOD)

Los parámetros de límite de blanco (LOB) y límite de detección (LOD) del Kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** se determinaron utilizando el dispositivo *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System*.

Para el cálculo del LOB, se utilizaron 16 muestras negativas en dos ensayos diferentes. En todos los casos se obtuvo el resultado negativo esperado permitiendo establecer un LOB al 95% de intervalo de confianza (IC) de $(0,09\% \pm 1,5E-4)$. Teniendo en cuenta el LOB obtenido, se evaluó el LOD con muestras de referencia diluidas a diferentes concentraciones (1%, 0,5% y 0,1%). Cada dilución se cargó 6 veces en el mismo ensayo para asegurar la precisión de los resultados. Los resultados obtenidos permitieron establecer un LOD de $(0,2\% \pm 5,4E-4)$.

11.3 | Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación del kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** se estimó realizando 6 réplicas con muestras de referencia diluidas hasta alcanzar una frecuencia alélica del 0,5%. Los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación para establecer el límite de cuantificación al 0,5% (CV < 25%).

11.4 | Especificidad

La especificidad analítica del kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** se determinó analizando 16 muestras negativas para variantes en los codones 835 y 836.

Además, se evaluó la posibilidad de reacciones cruzadas con otras variantes en codones contiguos. Para ello, se diseñó ADN sintético que contuviera los cambios p.R834Q/p.M837I. Mientras que no se obtuvo señal para p.M837I, sí se detectó la variante p.R834Q. Esta última variante sigue siendo relevante a nivel clínico, pero no está asociada a la resistencia a inhibidores de *FLT3*.

11.5 | Repetibilidad y reproducibilidad

Los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad del kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** se llevaron a cabo con una muestra de referencia diluida hasta alcanzar el LOQ establecido (0,5%). Esta muestra fue cargada en un único ensayo 8 veces para estimar la repetibilidad alcanzando un IC al 95% de $(0,4 \pm 4,3E-4)$. Para la reproducibilidad, se hicieron 4 réplicas por ensayo en tres días diferentes (12 medidas totales). En los ensayos de reproducibilidad se obtuvo un coeficiente variación (CV) del 6,07%, indicando una excelente precisión para el kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit**. Las Tablas 7 y 8 muestran los resultados obtenidos.

Réplica	Resultado esperado (%)	Resultado calculado (%)
1	0,5%	0,39
2		0,36
3		0,45
4		0,44
5		0,32
6		0,43
7		0,31
8		0,48
Promedio (%)		0,4
DS (%)		0,06
IC (95%)		$0,4 \pm 4,3E-4$

Tabla 7. Resultados de la evaluación de repetibilidad para el kit **FLT3-TKD2 dPCR OncoKit** de muestras evaluadas al límite de cuantificación. DS: desviación estándar. IC: intervalo de confianza.

Ensayo	Frecuencia esperada (%)	Frecuencia relativa (%)	MEDIA (%)	DS (%)	CV (%)
Día 1		0,34	0,48		
		0,53			
		0,64			
		0,47			
Día 2	0,5	0,62	0,52	0,03	6,07
		0,63			
		0,42			
		0,56			
Día 3		0,39	0,40		
		0,36			
		0,45			
		0,44			

Tabla 8. Resultados de la evaluación de reproducibilidad para el kit FLT3-TKD2 dPCR OncoKit de muestras evaluadas al límite de cuantificación DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

11.6 | Sensibilidad con muestras clínicas

Para determinar la sensibilidad del FLT3-TKD2 dPCR OncoKit se analizaron 23 muestras clínicas positivas para mutaciones en los codones diana (835 y 836), de las cuales, 21 albergan cambios en el codón 835 (p.D835Y/H/E/A/N/V) y 2 en el 836 (p.I836del). El rango de frecuencia alélica (VAF) de estas variantes va desde un 2% a un 48,7%. En todos los casos se detectó y cuantificó correctamente la variante esperada, estableciendo así una sensibilidad del 100%.

Contacte con nuestro Departamento Técnico para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos:

✉ tech.support@healthincode.com

☎ +34 963 212 340

healthincode



Conoce todos nuestros
kits de diagnóstico

