



Instrucciones de uso

cKIT dPCR OncoKit

Ref. IMG-407



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 **ckIT 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	20
	11.1 Muestras de validación	20
	11.2 Límite de blanco (LOB) y límite de detección (LOD)	20
	11.3 Límite de cuantificación (LOQ)	20
	11.4 Especificidad	21
	11.5 Repetibilidad y reproducibilidad	21
	11.6 Sensibilidad con muestras clínicas	22

01 Información general

La mastocitosis sistémica (MS) es una enfermedad hematológica rara caracterizada por una expansión anormal y acumulación de mastocitos patológicos en la piel y/u otros tejidos extracutáneos como la médula ósea o tracto gastrointestinal. A su vez la MS puede subdividirse en indolente, latente o agresiva que incluye: MS asociada con enfermedad hemática clonal que no pertenece al linaje de los mastocitos, MS agresiva y leucemia mastocítica.

El gen *KIT* es un proto-oncogén que codifica la proteína KIT, un receptor transmembrana (tirosina quinasa) involucrado en la proliferación de diferentes tipos celulares, entre ellos los mastocitos. Normalmente es activada tras la unión de su ligando, que desencadena la autofosforilación y dimerización. Concretamente, la mutación p.D816V conlleva un cambio conformacional en la proteína que la independiza de su ligando, activándose en consecuencia constitutivamente, aumentando la proliferación celular y reduciendo la tasa de apoptosis.

La gran mayoría de los pacientes (> 90%) con MS portan la mutación somática p.D816V, independientemente del subtipo diagnóstico y su clínica. Esta mutación está localizada en el exón 17 del cromosoma 4, en el segundo dominio de la tirosina quinasa (TK).

Además, la mutación p.D816V está asociada a la resistencia a la terapia con inhibidores de la tirosina quinasa (como el imatinib), por lo que su detección es muy importante para poder determinar la estrategia terapéutica.

Referencias

- > Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2001, pp 291-302.
- > García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez L, Nunez R, Prados A, Aldanondo I, Sanchez L, Domingue M, Botana L.M, Sanchez-Jimenez F, Sotlar K, Almeida J, Escibano L, Orfao A. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006 Oct 1;108(7):2366-2372. [oi: 10.1182/blood-2006-04-015545](https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015545). Epub 2006 Jun 1. PMID: 16741248.
- > González-López O, Muñoz-González JI, Orfao A, Álvarez-Twose I, García-Montero AC. Comprehensive Analysis of Acquired Genetic Variants and Their prognostic Impact in Systemic Mastocytosis. *Cancers (Basel)*. 2022; May 18;14(10):2487. [doi: 10.3390/cancers14102487](https://doi.org/10.3390/cancers14102487). PMID: 35626091; PMCID: PMC9139197.
- > Grootens J, Ungerstedt JS, Ekoff M, Rönnerberg E, Klimkowska M, Amini RM, Arock M, Jennine Grootens, Johanna S. Ungerstedt, et al. Single-cell analysis reveals the KIT D816V mutation in haematopoietic stem and progenitor cells in systemic mastocytosis. *Elsevier*. 2019; 150-158.
- > Galatà G, García-Montero AC, Kristensen T, Dawoud AAZ, Muñoz-González JI, Meggendorfer M, Guglielmelli P, Hoade Y, Alvarez-Twose I, Gieger C, Strauch K, Ferrucci L, Tanaka T, Bandinelli S, Schnurr TM, Haferlach T, Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Møller MB, Bindselev-Jensen C, Vannucchi AM, Orfao A, Radia D, Reiter A, Chase AJ, Cross NCP, Tapper WJ. Genome-wide association study

identifies novel susceptibility loci for KIT D816V positive mastocytosis. *Am J Hum Genet.* 2021 Feb 4;108(2):284–294. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.12.007. Epub 2021 Jan 8. PMID: 33421400; PMCID: PMC7895845.

- > Kristensen T, Vestergaard H, Møller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn.* 2011 Mar;13(2):180–8. doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.10.004. PMID: 21354053; PMCID: PMC3279709.
- > Alvarez-Twose I, Matito A, Morgado JM, Sánchez-Muñoz L, Jara-Acevedo M, García-Montero A, Mayado A, Caldas C, Teodósio C, Muñoz-González JI, Mollejo M, Escribano L, Orfao A. Imatinib in systemic mastocytosis: a phase IV clinical trial in patients lacking exon 17 KIT mutations and review of the literature. *Oncotarget.* 2016 Jul 19;8(40):68950–68963. doi: 10.18632/oncotarget.10711. PMID: 28978170; PMCID: PMC5620310.
- > Piris-Villaespesa M, Alvarez-Twose I. Systemic Mastocytosis: Following the Tyrosine Kinase Inhibition Roadmap. *Front Pharmacol.* 2020 Apr 14;11:443. doi:10.3389/fphar.2020.00443.PMID:32346366, PMCID:PMC7171446.

02 Uso previsto

El kit **ckIT dPCR OncoKit** está dirigido a la detección y cuantificación de la variante patogénica p.D816V (NM_000222.3:c.2447A>T; p.Asp816Val) en el gen *KIT* 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 que permite la cuantificación relativa del alelo mutado contra el alelo *wild-type*.

El kit **ckIT 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 relativa, rigurosa de la mutación p.D816V.

03 Características técnicas

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

Para la validación del **ckIT dPCR OncoKit** se ha diseñado ADN sintético independiente que contienen los alelos mutados 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. Asimismo, se analizaron muestras de pacientes previamente genotipadas con otras tecnologías.

La validación completa proporciona un método de detección y cuantificación relativa que permite establecer las siguientes **especificaciones técnicas**:

- ◇ **Tipo de muestra:** ADN genómico procedente de sangre periférica
- ◇ **Control positivo:** ADN sintético con la variante patogénica p.D816V en heterocigosis
- ◇ **Cantidad de ADN recomendado:** 65 ng
- ◇ **Límite de detección:** 0,06% \pm 1,8E-04
- ◇ **Límite de cuantificación:** 0,1%
- ◇ **Número de reacciones por muestra:** 1
- ◇ **Número de dianas:** 2 (alelo *wild-type* y alternativo)
- ◇ **Duración del programa de dPCR:** 1 h 45 min.

El kit **ckIT dPCR OncoKit** es compatible con la plataforma *QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System* (ThermoFisher 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 del 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 **cKIT dPCR OncoKit** está compuesto por los siguientes reactivos:

- ➔ **cKIT 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 la variante p.D816V, respectivamente.
 - agua libre de nucleasas.
- ➔ **Control positivo**: contiene ADN sintético con la variante p.D816V 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
cKIT dPCR OncoKit Master Mix	Disco rojo	2 X 12 rxn	4°C
Control positivo	Tapón rojo	6 rxn	4°C

Tabla 1. Componentes del kit cKIT 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 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 dPCR:

- ↳ FLT3-TKD2 dPCR OncoKit (ref. IMG-405)
- ↳ Imegen® Quimeras dPCR

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:

- ➔ cKIT 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 contaminación de los reactivos.

A continuación, se muestra el protocolo recomendado 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 para mezclar bien y mantener en hielo.
- 03 Añadir los siguientes reactivos en un tubo de 1,5 mL:

Reactivo	Volumen por reacción
cKIT 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 $\text{ng}/\mu\text{L}$ o de agua libre de nucleasas en el caso del control negativo de PCR a los tubos correspondientes, mezclar con vórtex y centrifugar durante 1 min.
- 06 En un ángulo de 45°, cargar 9 μL de los reactivos de PCR al fondo del pocillo de la placa *microfluidic array plate MAPI6*. 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 (MAPI6)*

Ensamblar las tiras de la placa MAPI7 en las 4 columnas de pocillos. Asegúrese de cubrir las columnas por completo y coloque las tapas de la placa MAP en todas, 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™	cKIT p.D816V	señal
VIC™	cKIT <i>Wild-type</i>	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.

Etapas	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	96°C	10 minutos
PCR Desnaturalización, anillamiento y extensión	40	96°C	5 segundos
		60°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 con el **cKIT dPCR OncoKit**. En la Tabla 4 se indican las especificaciones de cada una de las sondas. La sonda marcada con FAMTM se une al alelo mutado mientras que la sonda marcada en VICTM se une al alelo *wild-type*.

Sistema	Fluoróforo	Función	Quencher
cKIT dPCR OncoKit Master Mix	FAM TM	La sonda FAM TM se une al alelo mutado	MGB
	VIC TM	La sonda VIC TM se une al alelo <i>wild-type</i> .	MGB

Tabla 4. Información de las sondas de análisis.

El análisis de las muestras se realiza con el software específico del termociclador de PCR utilizado: *QuantStudioTM Absolute QTM Digital PCR Software*. Para la correcta interpretación de los resultados, deben fijarse los umbrales de fluorescencia para cada sonda mediante la visualización de los datos en un gráfico bidimensional (2D) o de nubes y establecer las coordenadas de los ejes, tal y como se indica a continuación:

+ Umbrales fijados:

- ◇ FAMTM = 2.000
- ◇ VICTM = 600

+ Ejes de la gráfica de nubes:

- ◇ Eje X (sonda marcada con VICTM): valor mínimo 0 y valor máximo 4.000
- ◇ Eje Y (sonda marcada con FAMTM): valor mínimo 2.000 y valor máximo 10.000

Al establecer el umbral para dos dianas en los gráficos 2D, se pueden identificar cuatro grupos o nubes. En la Figura 1 se muestra el resultado de un gráfico 2D esperado para una muestra positiva analizada con el **cKIT dPCR OncoKit** con los umbrales preestablecidos. La nube de puntos negros representa las microcámaras donde no se ha registrado señal para ninguna sonda, es decir, donde no ha habido amplificación. La nube morada representa particiones en las que únicamente ha habido amplificación del alelo mutado p.D816V (marcado con la sonda FAMTM), mientras que la naranja corresponde a las particiones positivas donde únicamente se ha amplificado el alelo *wild-type* (marcado con la sonda VICTM). La nube verde representa las particiones en las que se han amplificado ambos alelos.

Siguiendo el mismo fundamento, la Figura 2 corresponde a una muestra *wild-type* en la que únicamente se observa amplificación con la sonda VICTM (nube naranja) y particiones en las que no ha habido amplificación (nube negra). La Tabla 5 resume la interpretación de estos resultados.

↘ Control positivo heterocigoto para la variante p.D816V:

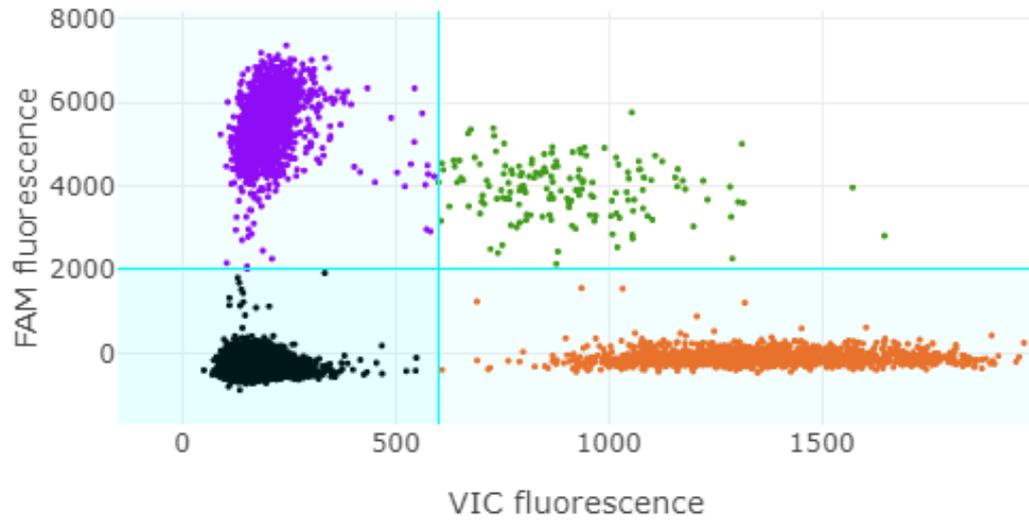


Figura 1. Gráfico bidimensional (2D) de un ensayo de dPCR con el control positivo de cKIT dPCR OncoKit. Se observa señal en FAM™ para el alelo mutado (nube morada), FAM™+VIC™ (nube verde) y en VIC™ (nube naranja) para el alelo wild-type. Los puntos negros son particiones donde no se ha producido amplificación.

↘ Muestra wild-type:

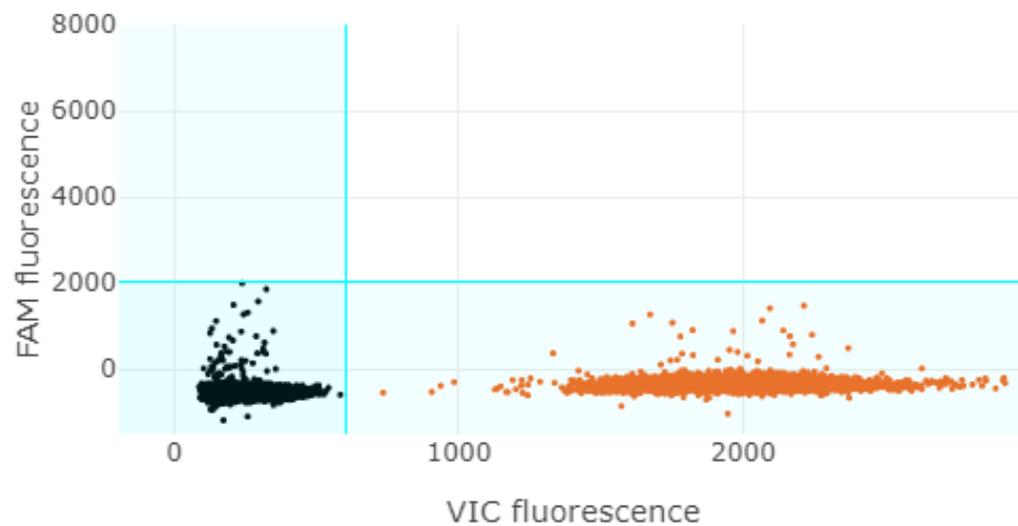


Figura 2. Gráfico bidimensional (2D) de un ensayo de dPCR con una muestra wild-type obtenido con el kit cKIT dPCR OncoKit. Se observa amplificación en el canal VIC™ (nube naranja). Los puntos negros son particiones donde no se ha producido amplificación.

Interpretación de resultados		
Muestra	FAM™	VIC™
Wild-type	-	-
Variante p.D816V	-	+

Tabla 5. Interpretación del genotipo de una muestra de gDNA según las señales obtenidas.

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 la mutación p.D816V (%) expresada como una medida relativa de la variante p.D816V respecto al número de copias totales del gen *KIT* de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ p. D816V} = \frac{FAM}{(FAM + VIC)} \times 100$$

Donde:

- **FAM:** son las copias/μL para FAMTM reportadas por el programa de análisis (alelo mutado).
- **VIC:** son las copias/μL para VICTM reportadas por el programa de análisis (alelo *wild-type*).

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 FAMTM ni en el canal VICTM.
- ◇ Hay señal para los dos canales (FAMTM y VICTM) en la reacción con el control positivo con un valor de cuantificación del 50% (±10%).
- ◇ En el caso de obtener resultados diferentes a los expuesto en este apartado, consultar la sección "09. *Troubleshooting*" de este manual.

09 Troubleshooting

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

Control	Resultado		Causa
	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 - (ausencias) 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. Se recomienda limpiar 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 **ckIT dPCR OncoKit** es capaz de detectar únicamente la variante p.D816V en el gen *KIT*, presente en un 90% de pacientes con mastocitosis sistémica. Otras posibles variantes puntuales relacionadas con la mastocitosis sistémica quedan fuera del alcance de este kit.

10.2 | Equipos

El kit **ckIT dPCR OncoKit** ha sido validado usando la plataforma de amplificación:

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

10.3 | Reactivos

El kit **ckIT dPCR OncoKit** se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado "06. Equipos, reactivos y materiales que no se suministran" de este manual.

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 **ckIT 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 **ckIT dPCR OncoKit** se han diseñado ADN sintético independiente que contienen el alelo alternativo p.D816V y *wild-type*. Asimismo, el kit ha sido validado con 14 muestras clínicas positivas para la variante p.D816V. Además, se han utilizado 16 muestras negativas para la mutación de interés para determinar la sensibilidad y especificada del kit.

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

Los parámetros de límite de blanco (LOB) y límite de detección (LOD) del kit **ckIT 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 $(0,02\% \pm 4E-05)$. Teniendo en cuenta el LOB obtenido, se evaluó el LOD en 6 réplicas con una muestra de paciente positiva diluida hasta alcanzar una frecuencia alélica del 0,1%. Los resultados obtenidos permitieron establecer un LOD al 0,06% con un IC del 95% de $(0,06\% \pm 1,8E-04)$.

11.3 | Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación del **ckIT dPCR OncoKit** se estimó realizando 6 réplicas con muestras de pacientes diluidas hasta alcanzar una frecuencia alélica del 0,1%. Los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación para establecer el límite de cuantificación ($CV < 25\%$).

11.4 | Especificidad

La especificidad analítica del kit **ckIT dPCR OncoKit** se determinó analizando 16 muestras negativas para la variante p.D816V. Además, se evaluó la posibilidad de reacciones

cruzadas con otros cambios en el mismo codón de *cKIT*. Para ello, se diseñó ADN sintético con las variantes p.D816H y p.D816Y que fueron posteriormente diluidas a diferentes VAFs (50% y 5%) y cargadas en duplicado. En ningún caso se detectó señal superior al LOD, resultando en una especificidad del 100% para el sistema diseñado.

11.5 | Repetibilidad y reproducibilidad

Los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad del kit **cKIT dPCR OncoKit** se han evaluado con muestras de ADN sintético con la variante de interés al LOQ establecido (0,1%). Esta muestra fue cargada en un único ensayo 8 veces para estimar la repetibilidad alcanzando un intervalo de confianza (IC) del 95% de $(0,12\% \pm 1,4E-4)$. Para la reproducibilidad, se hicieron 4 réplicas por ensayo en tres días diferentes (12 medidas totales) en los que se obtuvo un coeficiente variación (CV) del 2,81%, indicando una excelente precisión para el kit **cKIT dPCR OncoKit**. Las Tablas 7 y 8 recogen estos resultados.

Réplica	Resultado esperado (%)	Resultado calculado (%)
1	0,1%	0,09
2		0,15
3		0,11
4		0,14
5		0,10
6		0,13
7		0,10
8		0,13
Promedio (%)		0,12
DS (%)		0,02
IC (95%)		$0,12 \pm 1,4E-4$

Tabla 7. Resultados de la evaluación de repetibilidad para el kit **cKIT 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		0,17	0,15		
		0,16			
		0,17			
		0,13			
Día 2	0,1	0,15	0,15	0,00	2,81
		0,15			
		0,13			
		0,12			
Día 3		0,15	0,16		
		0,13			
		0,14			

Tabla 8. Resultados de la evaluación de reproducibilidad para el kit cKIT 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 cKIT dPCR OncoKit se analizaron 14 muestras clínicas positivas para el cambio p.D816V. El rango de frecuencia alélica (VAF) de estas variantes va desde un 0,56% a un 20,52%. En todos los casos se detectó 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