PlentiPlex™ MYD88

Waldenström Lymphoma qPCR Assay

In Vitro Diagnostisk Assay til Detektering af MYD88 L265P

Brugsanvisning

REFERENCE NUMMER

Dispense Ready (DR)
1500 (20 reaktioner)

Ready-to-Use (RTU)
1849 (12 reaktioner)
1850 (24 reaktioner)

Version 4.0
Sidst revideret: Januar 2023

CE IVD

PentaBase

PentaBase A/S
Petersmindevej 1A
DK-5000 Odense C

+45 36 96 94 96
info@pentabase.com
www.pentabase.com

Indholdsfortegnelse

1 FORMÅL ... 3

1.1 BEREGNET BRUGER ... 3

2 TESTPRINCIPPET ... 3

2.1 FORKLARING AF ANALYSEN ... 3

2.1.1 HydrolEasy® prober ... 3

2.1.2 BaseBlockers™ ... 3

2.2 PRODUKT VARIANTER ... 4

2.3 PRINCRIPPET FOR PROCEDUREN ... 4

2.3.1 Intern kontrol ... 4

2.3.2 Reference assay ... 4

2.3.3 Mutations specifikt assay ... 4

3 REAGENTER AND MATERIALER ... 5

3.1 OPBEVARING OG STABILITET ... 5

3.1.1 Stabilitet under brug ... 5

3.2 MEDFØLGENDE MATERIALER ... 5

3.3 MATERIALER OG INSTRUMENTER DER KRÆVES, MEN IKKE MEDFØLGER ... 5

4 ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER ... 6

5 HÅNDTERING AF PRØVER ... 6

5.1 HÅNDTERING AF PRØVER, TRANSPORT OG OPBEVARING ... 6

5.2 OPRENSNING ... 6

5.3 POSITIV KONTROL OG NO TEMPLATE CONTROL ... 6

6 FREMGANGSMÅDE ... 7

6.1 DISPENSE READY ... 7

6.2 READY-TO-USE ... 7

6.3 REAL-TIME QPCR-PROGRAM ... 7

7 DATA ANALYSE ... 7

7.1 INDSTILLINGER FOR TÆRSKELVÆRDI OG BASELINE ... 7

7.1.1 Korrigering for baseline drift og indstilling af tærskelværdi ... 8

7.2 VERIFICERING AF PRØVEINDTASTNING OG GYLDIGHED AF KØRSLEN ... 8

7.2.1 Udregning af ΔCt ... 9

7.3 FORTOLKNING AF RESULTATER ... 9

7.3.1 Intern kontrol analyse ... 10

7.3.2 Ugyldige reference og intern kontrol resultater ... 10

7.3.3 Estimering af mutationsfrekvens ... 11

8 PERFORMANCE EVALUERING ... 11

8.1 ANALYTISK SENSITIVITET ... 11

8.1.1 Limit of Blank ... 11

8.1.2 Limit of Detection ... 11

8.1.3 Linearitet ... 12

8.2 ANALYTISK PRÆCISION ... 13

8.2.1 Within-laboratorie repeterbarhed og reproducerbarhed ... 13

8.3 ANALYTISK SPECIFICITET ... 13

8.4 KLINISK EVALUERING ... 13

9 BEGRÆNSNINGER ... 14

10 SYMBOLER ... 15

11 PRODUCENT OG DISTRIBUTØRER ... 15

1 Formål

PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er en semi-kvantitativ real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) analyse beregnet til in vitro-diagnostik af den genomiske DNA-ændring, der resulterer i leucin-til-prolin mutation i kodon 265 (L265P) af Myeloid differentiation primary response 88 (MYD88) proteinet. Prøver skal opnås fra Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) væv eller blodprøver. Testen anvendes med real-time PCR-systemer, og prøver kan forberedes ved hjælp af automatiserede platforme eller manuelle arbejdsgange. De opnåede resultater af PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er beregnet til at identificere tilstedeværelsen af MYD88 L265P og facilitere diskrimination mellem Lymphoplasmacytisk lymfom/Waldenström-makroglobulinæmi (LPL/WM) og non-Hodgkin lymfom.

1.1 Beregnet bruger

PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er beregnet til brug af sundhedsfagfolk eller kvalificeret laboratoriepersonale, der er instrueret og trænet i teknikkerne for real-time qPCR samt kyndige i håndtering af biologiske prøver. Medicinske interventioner baseret på resultater fra dette produkt kræver medicinsk autorisation.

2 Testprincippet

2.1 Forklaring af analysen

PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay kombinerer allelspecifik PCR med PentaBase's nye og selektive teknologier, der omfatter både standard og modificerede syntetiske oligonukleotider som HydrolEasy® prober og BaseBlockers™ til specifik og følsom amplifikation. Teknologien kan anvendes på standardudstyr til real-time PCR, herunder PentaBases egne instrumenter, ved hjælp af standardprocedurer. Modificerede oligonukleotider indeholder mindst en syntetisk DNA-analog (kaldet pentabaser), der består af et flad heteroaromatisk, hydrofobt molekyle og en linker. Disse modificeringer indsættes i oligonukleotiderne på faste positioner under syntesen. Ved brug af PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay kan MYD88 L265P somatiske mutationer detekteres hurtigt (mindre end to timer), følsomt (5-50 ng gDNA input pr. brønd/vial) og selektivt (0,6% og 0,75% detektionsgrænse for MYD88 L265P-mutation i baggrunden af hhv. vildtype gDNA fra fuldblods- og FFPE-prøver) ved hjælp af real-time qPCR analyse.

2.1.1 HydrolEasy® prober

En HydrolEasy®-probe ligner en standard hydrolyseprobe (også kaldet en TaqMan™-probe[1]), der er mærket med en fluorofor i 5'enden og en 'quencher' i 3'enden, men med tilføjelsen af pentabaser. HydrolEasy®-prober er baseret på oligomerer modificeret med pentabaser, hvilket giver proben et markant forbedret signal-støj-forhold, højere specificitet og større følsomhed sammenlignet med konventionelle hydrolyseprober. HydrolEasy®-prober i PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er mærket med PentaGreen™ ($\lambda_{ex.}$ 495 nm og $\lambda_{em.}$ 516 nm, detekteret på samme kanal som FAM) i kombination med en Green Quencher™ og med PentaYellow™ ($\lambda_{ex.}$ 533 nm og $\lambda_{em.}$ 557 nm, detekteret på samme kanal som HEX/VIC®[2]/TET) i kombination med en Yellow Quencher™.

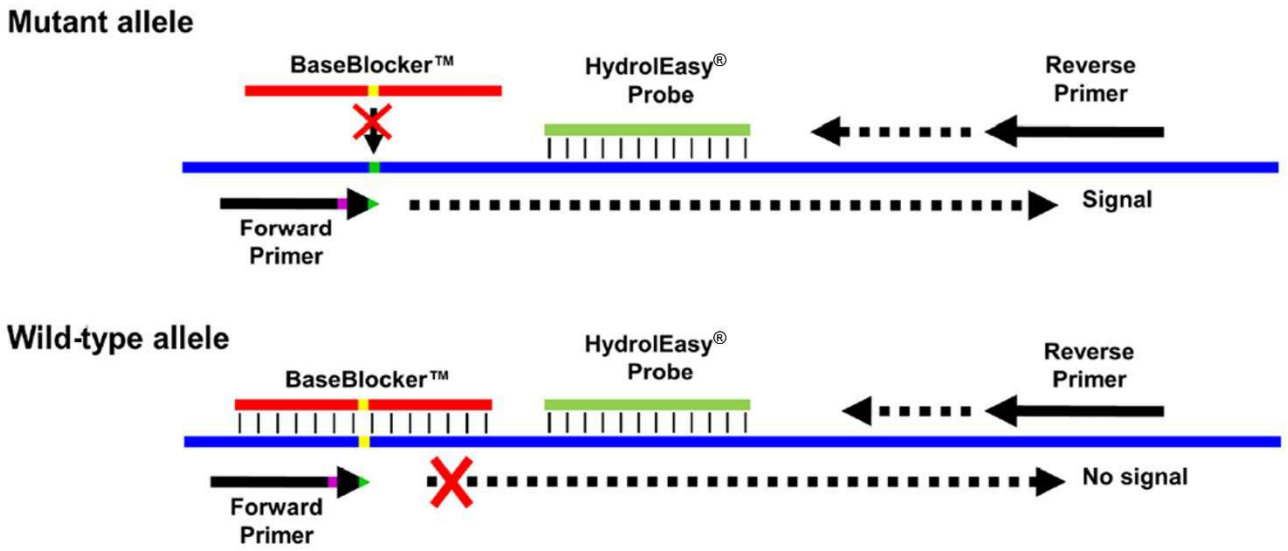
2.1.2 BaseBlockers™

BaseBlockers™ er oligonukleotider modificeret med adskillige pentabaser, hvilket muliggør specifik og stærk binding til en target sekvens (**Figur 1**). I PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er BaseBlocker™ teknologien designet til at binde til vildtype gDNA-target, undertrykke amplificeringen af vildtype DNA ved at hindre bindingen af den mutations specifikke primer til vildtype-templaten. Tilstedeværelsen af BaseBlockers™ sikrer høj specificitet og robusthed af testen og eliminerer risikoen for falske positive signaler.

[1]TaqMan er et registreret varemærke tilhørende Roche Molecular Systems, Inc.

[2]VIC er et registreret varemærke tilhørende Applied Biosystems, Inc.

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com



Figur 1. Illustration af, hvordan BaseBlockers™ fungerer i PlentiPlex™ assays. En BaseBlocker™ binder til og blokerer for amplificeringen af vildtype-templaten (modificeret fra Riva et al. 2017). Derimod hæmmer BaseBlocker™ ikke amplificeringen af en template med en enkelt nukleotidmutation, og resultatet er en selektiv amplificering af muteret gDNA i en vildtype-baggrund.

2.2 Produkt varianter

PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay leveres enten som Dispense Ready (DR) eller Ready-to-Use (RTU). DR-versionen inkluderer Primer-Probe Mix og Master Mix i separate rør, som skal doseres i passende plastikbeholdere, inden template tilsættes. RTU-versionen er forud-doseret og kræver kun tilsætning af template inden real-time qPCR.

2.3 Princrippet for proceduren

2.3.1 Intern kontrol

Der medfølger en intern kontroltest i både reference- og mutations specifikke assays. Den består af en HydrolEasy®-probe mærket med PentaYellow™ (målt på samme fluorescenskanal som HEX/VIC®/TET) og et sæt primere. Den interne kontroltest bruges til at vurdere, om template er blevet tilsat, og om der er sket amplifikation i reaktioner med negativt signal fra assays mærket med PentaGreen™ i samme reaktion. Primerne i kontroltesten er designet til at være ineffektive og er placeret uden for området for alle kendte mutationer. På denne måde vil den interne kontroltest have så lidt indflydelse som muligt på effektiviteten af reference- og mutations specifikke assays. Signalet fra den interne kontroltest kan påvirkes af positiv amplifikation i reference- og mutations specifikke assays. Se sektion 7 for flere detaljer.

2.3.2 Reference assay

Reference assayet retter sig mod en genomisk region inden for MYD88-genet uden kendte sekvensvariationer og bruges til at vurdere mængden af amplificerbart DNA i prøven. Reference assayet indeholder en HydrolEasy®-probe mærket med PentaGreen™ (målt på samme kanal som FAM), et mutationsuafhængigt primer-sæt og en intern kontroltest. Reference-testen køres i sin egen tube eller brønd. Fluorescenssignalet fra reference assayet bruges til at beregne tærskelværdien, som igen bruges til at bestemme cyklustærskelværdien (Ct) for testen af interesse. Cyklustærskelværdien for reference assayet er en måling af mængden af amplificerbart DNA i den evaluerede prøve og bruges til beregning af mutations-ΔCt. Se sektion 7 for flere detaljer.

2.3.3 Mutations specifikt assay

Det mutations specifikke assay retter sig mod den genomiske region, der indeholder MYD88 L265P-mutationen (c.794T>C) og bruges til at bestemme tilstedeværelsen af mutationen i en prøve (**Tabel 1**). Det mutations specifikke assay indeholder en HydrolEasy®-probe mærket med PentaGreen™ (målt på FAM-kanalen), en BaseBlocker™ (for at reducere eller eliminere ikke-specifik amplificering af vildtype-template), et mutations specifikt primer-sæt og en intern kontroltest. Det mutations specifikke assay er optimeret til betingelserne specificeret i sektion 6, og det er derfor vigtigt, at disse følges for at undgå vildledende resultater. Ct-værdierne for det mutations specifikke assay og den tilsvarende reference bruges til at afgøre, om en prøve er positiv eller negativ for den givne mutation. Se sektion 7 for flere detaljer.

Tabel 1. MYD88 mutationen detekteret med PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay.

Assay	CDS mutation	Aminosyreudskiftning	Cosmic ID
MYD88 L265P	c.794T>C	p.Leu265Pro	COSM85940

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

3 Reagenter and materialer

Materialer, der leveres med PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymfom qPCR-test, kan findes i **Tabel 2**. Materialer og instrumenter, der kræves, men ikke medfølger, kan findes i **Tabel 3**.

3.1 Opbevaring og stabilitet

Se etiketten for udløbsdato og opbevaringsbetingelser. Gentagen optøning og frysning bør holdes på et minimum og bør ikke overstige 12 fryse-optø cyklusser.

3.1.1 Stabilitet under brug

Når assay-komponenterne er i brug, skal de returneres til fryseren hurtigst muligt efter brug for at minimere tiden ved stuetemperatur og eksponering for lys. Brugte Ready-to-Use PCR-rør og benyttede Primer-Probe og Master Mix skal bortskaffes i henhold til dine lokale retningslinjer for bortskaffelse af biologisk affald. Reagenserne inkluderet i PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay må ikke genanvendes.

3.2 Medfølgende materialer

Tabel 2. Liste over materialer som følger med PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay som enten Dispense Ready (DR) eller Ready-to-Use (RTU).

Produkt variant	Beskrivelse	Tube nr.		Kit komponenter	Mutation	Indhold
		DR	RTU			
Y1	**PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay**	1 2 3 4	A B - -*	MYD88 Reference 1 MYD88 L265P Simplex AmpliQueen™ Master Mix MYD88 Positiv Kontrol	- L265P - L265P	Syntetisk DNA Syntetisk DNA PCR Master Mix Syntetisk DNA

*Leveret separat i et rør.

3.3 Materialer og Instrumenter der kræves, men ikke medfølger

Materialer og instrumenter, der kræves, men ikke medfølger, er angivet i **Tabel 3**. PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er designet til at køre på åbne platforme med mindst to kanaler (grøn og gul) og er blevet valideret ved brug af prøver oprenset med BasePurifier™ Nucleic Acid Extraction System (BasePurifier™, PentaBase ref. nr. 715) og analyseret med BaseTyper™ 48 (PentaBase, ref. nr. 754), CFX96 Touch (Bio-Rad, ref. nr. 18450974), QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™ ref. nr. A28574), Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems) eller LightCycler® 480 II (Roche, ref. nr. 05 015 278 001) i real-time PCR-instrumenter. Andre real-time PCR-platforme er sandsynligvis anvendelige, men det anbefales kraftigt, at der udføres en specifik validering med kliniske prøver og referencekontroller, når der køres på andre instrumenter, for at verificere cyklustærskler og cut-offs. Kontakt PentaBase A/S eller din lokale distributør for support.

Tabel 3. Materialer der kræves, men ikke medfølger, for at kunne bruge PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay.

Materialer
Pipetter (1-10 µL, 10-100 µL)
Sterile pipettespidser
Centrifuge til at spinne PCR-rør, strips eller plader
Nuklease-frit vand til No Template Control (NTC)
DNA-ekstraktions kit eller instrument
DNA-ekstraktions kit eller instrument (f.eks. BasePurifier™ 32, PentaBase A/S)
DNA-ekstraktions kit til FFPE eller blod prøver (f.eks. Nucleic Acid Extraction Kit til FFPE DNA-ekstraktion, Xi'an TianLong Science and Technology Co., Ltd., distribueret af PentaBase A/S, Ref. No. T165H)
Real-time qPCR instrumenter
Real-time PCR instrument (f.eks. BaseTyper™, Pentabase)

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

4 Advarsler og forholdsregler

- Til in vitro diagnostisk brug.
- Den mutationelle status afgjort af PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay skal altid vurderes sammen med andre kliniske symptomer og diagnoser ved træffelse af behandlingsbeslutninger.
- God laboratoriepraksis og omhyggelig overholdelse af de angivne procedurer i disse brugsanvisninger er nødvendig. Bær laboratoriekittel, laboratoriehandsker og øjenbeskyttelse, når du håndterer biologiske prøver og reagenser. Laboratoriehandsker skal skiftes mellem håndtering af forskellige biologiske prøver. Arbejd desuden i rene miljøer for at undgå forurening.
- Tag handsker af og vask hænder grundigt efter håndtering af prøver og reagenser.
- Brug ikke reagenser, der er udløbet.
- Brug ikke beskadigede PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay-rør.
- Brug ikke et PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay, der er forudfyldt i et RTU PCR-rør, hvis det er blevet tabt, mens det er åbent.
- Åbn ikke rørene eller brøndene under eller efter amplifikation efter afslutningen af PCR-programmet.
- Verificer egnetheden af DNA-prøver, da DNA-prøver kan være ikke-homogene og af varierende kvalitet, hvilket kan påvirke analysen. I tilfælde af mistænkt DNA-degradation anbefales det at verificere DNA-integritet og mængden af amplificerbart DNA ved en PCR-baseret metode.
- Vær opmærksom på placeringen og orienteringen af PCR-rør i PCR-maskinen i forhold til, hvordan prøverne er navngivet i PCR-softwaren.
- Baseline drift, et langsomt stigende signal i amplifikationsplottet uden eller med sen eksponentiel fase, kan føre til falske positive resultater, hvis det ikke rettes. Se afsnit 7 for mere information.
- Konsulter relevante brugervejledninger til real-time qPCR-instrumenter for yderligere advarsler, forsigtighedsforanstaltninger og procedurer for at reducere risikoen for forurening.
- Bortskaf brugte PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay-rør, pipettespidser og prøverør i overensstemmelse med lokale, statslige og føderale regler for farligt biologisk materiale.
- Minimer eksponeringen af PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay for lys på grund af tilstedeværelsen af lysfølsomme HydrolEasy® prober.
- Reagenserne bør ikke fortyndes til en lavere koncentration end angivet i protokollen. Dette kan påvirke ydeevnen af testen.
- Udskift ikke reagenserne med andre, da det kan påvirke testens ydeevne.
- Utilstrækkelig eller uhensigtsmæssig indsamling, opbevaring og transport af prøver kan give forkerte eller ugyldige resultater.
- Brug forsigtighed for ikke at forurene reagenser og prøver. Dedikerede pipetter bør anvendes, og det anbefales at have separate områder til prøveforberedelse og PCR-kørsel. Skift pipettespids mellem loading af prøve til reference og mutations specifikt rør for at undgå forurening af reagenserne. Brug desuden forsigtighed for ikke at forurene patientprøve PCR-rør ved at tilsætte PlentiPlex™ MYD88 L265P Positiv Kontrol eller flere patientprøver i det samme PCR-rør.

5 Håndtering af prøver

5.1 Håndtering af prøver, transport og opbevaring

Prøverne skal være humant genomisk DNA ekstraheret fra Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) væv eller fuldblod. Det anbefales, at FFPE- og blodprøver indsamles, transporteres, behandles og opbevares i overensstemmelse med henholdsvis ISO 20166-3:2018 og ISO 20186-2:2019 for at sikre optimal DNA-kvalitet.

5.2 Oprensning

Ekstraktion af genomisk DNA fra FFPE- og blodprøver bør udføres ved hjælp af genomisk DNA-ekstraktionskits og/eller procedurer specielt designet til håndtering af FFPE- og fuldblodsprøver i overensstemmelse med producentens anvisninger, herunder trin til deparaffinering og prøvedigestion for at fjerne PCR-hæmmere, der er indlejret i prøven. Det anbefales at evaluere DNA-integritet og amplificeringsevne ved hjælp af PCR-baserede metoder i overensstemmelse med ISO 20166-3:2018.

5.3 Positiv kontrol og No Template Control

Det anbefales at inkludere mindst én positiv kontrol (medfølger) og én No Template Control (NTC) (f.eks. nukleasefrit vand, medfølger ikke) i hver kørsel af PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay. Den medfølgende positiv kontrol består af cirka 120 MYD88 L265P syntetiske DNA-kopier og 1,2 ng human vildtype gDNA pr. mikroliter.

BEMÆRK: Den positive kontrol (og NTC) skal tilsættes både et reference- og et mutations specifikt assay.

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

6 Fremgangsmåde

Analyser hver prøve med både reference assayet og det mutations specifikke assay. Disse skal analyseres i den samme PCR-kørsel for at sikre minimal variation.

6.1 Dispense Ready

1. Tilsæt 12,5 µL AmpliQueen™ RT-qPCR Master Mix til hver PCR-rør (hætteglas, strip, plade).
2. Tilsæt 7,5 µL af Reference Mix eller Mutant Mix til PCR-rørene.
3. Tilsæt 5 µL ekstraheret DNA (1-10 ng/µL) (prøve eller positiv kontrol) til både mutations specifikt assay og den tilsvarende reference. Det anbefales at inkludere en NTC i hver kørsel. Tilsæt nuklease-frit vand til NTC i stedet for gDNA.
4. Forsegl alle rør.
   'Valgfrit trin: Vortex strips kortvarigt (2-3 sek.) for at forbedre fjernelse af luftbobler.'
5. Centrifugér PCR-rørene (1-2 minutter ved 4000-5000 rpm.) for at sikre, at alle reagenser indsamles i bunden af rørene og luftbobler fjernes.
6. Placer PCR-rørene i Real-Time PCR-instrumentet og kør RT-qPCR-programmet (**Tabel 4**).

6.2 Ready-to-Use

1. Centrifugér PCR-stripsene (1-2 minutter ved 4000-5000 rpm.) for at sikre, at alle reagenser indsamles i bunden af rørene for at eliminere luftbobler.
2. Tilsæt 5 µL ekstraheret DNA (1-10 ng/µL) (prøve eller positiv kontrol) til både mutations specifikt assay og den tilsvarende reference. Det anbefales at inkludere en NTC i hver kørsel. Tilsæt nuklease-frit vand til NTC i stedet for gDNA.
3. Forsegl alle rør. 'Valgfrit trin: Vortex strips kortvarigt (2-3 sek.) for at forbedre fjernelse af luftbobler.'
4. Centrifugér PCR-rørene (1-2 minutter ved 4000-5000 rpm.) for at sikre, at alle reagenser indsamles i bunden af rørene og luftbobler elimineres. Placer PCR-rørene i Real-Time PCR-instrumentet og kør RT-qPCR-programmet (**Tabel 4**).

6.3 Real-time qPCR-program

Tabel 4. RT-qPCR-program til kørsel af PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay. Fluorescens registreres på den grønne og gule kanal ved det andet trin i 3-trins amplifikationen (ved 57°C).

Protokol	Temperatur [°C]	Tid [sek]	Cykler	Kanal
Fase 1				
Hold	95	120	1	
Fase 2 (1-45)				
3-step amplifikation	94	15	45	
	57	10		FAM/SYBR (Grøn) HEX/VIC®/TET (Gul)
	72	15		

7 Data Analyse

7.1 Indstillinger for tærskelværdi og baseline

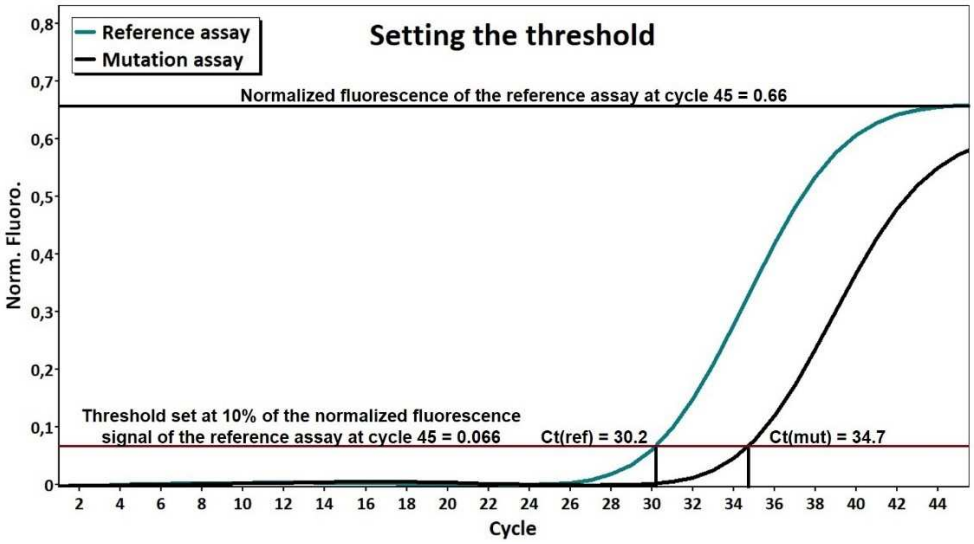
Dataanalyseproceduren for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay involverer bestemmelse af cyklustærsklen (Ct). Ct er defineret som cyklussen, hvor fluorescenssignalet for en given assay overstiger tærskelværdien, der er fastlagt som en del af analyseproceduren. Ct-værdien afspejler mængden af amplificerbart target DNA til stede i prøven. Tærsklen bør indstilles til 10 % af referenceassayets (Rør A) fluorescenssignal ved cyklus 45 for hver prøve (**Figur 2**).

Før du indstiller tærsklen og beregner Ct-værdierne, er det vigtigt, at eventuel baseline drift eller svingning korrigeres, så den normaliserede baseline- eller baggrundssfluorescens er så tæt på nul som muligt. Baseline drift er et langsomt stigende signal i amplifikationsplottet uden eller med sen eksponentiel fase og kan forekomme, når baselinen ikke er blevet justeret korrekt. Forskellige instrumentproducenter anvender forskellige tilgange til at justere baseline. Dette inkluderer hældningskorrektion, kurveudjævning, indstilling af et baseline cyklusinterval og ignorering af de første cykler i kørslen. Se instrument-specifikke retningslinjer for specifikke instruktioner, når de er tilgængelige, eller kontakt PentaBase A/S eller din lokale distributør for teknisk assistance.

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

I tilfælde, hvor det ikke er muligt at justere den normaliserede baggrundsfluorescens til nul, bør værdien af baggrundsfluorescens ved cyklus 20 lægges til tærskelværdien, der er beregnet ved at tage 10 % af reference-signalet ved cyklus 45 (**Tabel 5**).

BEMÆRK: Hvis baseline drift ikke kan korrigeres, og/eller der er tvivl om kvaliteten af amplifikationskurven, bør prøven køres igen.



Figur 2. Indstilling af tærskelværdien. Læs fluorescensværdien for referenceassayet ved cyklus 45 og indstil tærsklen til 10 % af denne værdi. Denne tærskel bruges nu til at bestemme Ct-værdierne for referenceassayet og det tilsvarende mutations specifikke assay. I det viste eksempel er Ct(reference) = 30,2 og Ct(mutation) = 34,7. Således er prøven ifølge **Tabel 7** positiv for den analyserede mutation.

7.1.1 Korrigering for baseline drift og indstilling af tærskelværdi

1. Brug hældningskorrektion/kurvetilpasning, når det er muligt, og/eller definer baseline- eller baggrundscyklusintervallet mellem cyklus 15 og cyklus 20.
2. Indstil tærsklen til 10 % af signalet i referenceassayet ved cyklus 45 (**Figur 2**). Læg enhver betydelig baseline-fluorescens ved cyklus 20 til tærskelværdien (**Tabel 5**).

Tabel 4. Indstilling af tærskelværdien i tilfælde, hvor baggrunds fluorescens er over 0.

Reference fluorescence ved cyklus 45	10% af reference fluorescence ved cyklus 45	Assay baseline/baggrund fluorescence ved cyklus 20	Tærskelværdi
3	0,3	0	0,3
3	0,3	0,2	0,5

7.2 Verificering af prøveindtastning og gyldighed af kørslen

Før mutationsstatus af de undersøgte prøver bestemmes, bør prøveindtastningen og kørslens gyldighed verificeres.

1. Verificer, at referenceassayets (Rør A) grønne kanals Ct-værdier for alle prøver og positive kontroller enten er gyldige eller borderline ifølge **Tabel 6**.
   a. Hvis nogle af prøverne ikke opfylder kravene til gyldige eller grænsende Ct-værdier for referenceassayet som beskrevet i **Tabel 6**, kør disse prøver igen med enten mere (Ct(reference) > 36) eller mindre (Ct(reference) < 25) DNA.
   b. Hvis referenceassayets (Rør A) grønne kanals Ct-værdier for positiv kontrolprøverne er ugyldige, er hele kørslen ugyldig, og resultaterne bør ikke bruges (Se **Tabel 6**). Sørg for, at qPCR-programmet er defineret korrekt, og at instrumentet registrerer på FAM (grøn) og HEX/VIC®/TET (gul) kanaler (**Tabel 4**). Hvis qPCR-programmet er korrekt, kan reagenserne til positiv kontrol være nedbrudte, eller PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay kan være ikke funktionel. Hvis du ikke kan finde årsagen til problemet, bedes du kontakte PentaBase A/S eller din lokale distributør for support.

2. Hvis NTC-prøver er inkluderet i kørslen, verificer at de grønne og gule kanal-referenceassay (Rør A) Ct-værdier er > 38 og at de grønne og gule kanal-mutations specifikke assay (Rør B) Ct-værdier er > 45 for de inkluderede NTC(er). Kørsler med NTC Ct-værdier under disse grænser indikerer forurening, og resultaterne af hele kørslen bør anses for ugyldige. Find årsagen til forureningen ved at kontrollere eller erstatte alle potentielle kilder til forurening, såsom pipetter og instrumenter. Hvis forureningen ikke kan lokalisere, kontakt PentaBase A/S eller din lokale distributør.

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

Tabel 5. Acceptable grøn kanals Ct-værdier for reference assayet.

Reference assay	Fortolkning	Kommentar
Ct < 25	Ikke gyldig	Mængden af tilført DNA er for høj, hvilket kan påvirke testens ydeevne. Analysen bør gentages med en lavere mængde tilført DNA.
25 ≤ Ct ≤ 30	Gyldig	Mængden af tilført DNA er optimal for mutationsanalyse.
30 < Ct ≤ 36	Borderline	Mængden af tilført DNA er lavere end anbefalet. Dette påvirker sensitiviteten. Hvis MYD88 L265P-mutationen ikke påvises, bør analysen om muligt gentages med en større mængde indsat DNA (se **Tabel 7**).
Ct > 36	Ikke gyldig	Mængden af tilført DNA er for lav. Analysen bør gentages med en større mængde indsat DNA.

7.2.1 Udregning af ΔCt

For at afgøre, om MYD88 L265P-mutationen påvises eller ej, beregnes en ΔCt-værdi for de grønne kanal assays for hver prøve og positiv kontrol. ΔCt-værdien defineres som forskellen mellem den grønne kanal Ct-værdi for det mutations specifikke assay (Rør B) trukket fra den grønne kanal Ct-værdi for det tilsvarende referenceassay (Rør A):

$$\Delta Ct = Ct_{(mutationspecifik\ assay)} - Ct_{(reference\ assay)}$$

1. For at verificere, at PCR-kørslen er udført korrekt, skal du for hver positiv kontrol med en gyldig eller borderline Ct-værdi$_{(referenceassay)}$ (**Tabel 6**) beregne den grønne kanal ΔCt for det mutations specifikke assay (Rør B) mod det tilsvarende referenceassay (Rør A).
2. Verificer, at ΔCt for inkluderede positive kontrol(er) er < 4.
    a. Hvis den grønne kanal ΔCt for nogen inkluderede positive kontrol(er) er ≥ 4, er hele kørslen ugyldig, og resultaterne bør ikke anvendes. Sørg for, at qPCR-programmet er defineret korrekt, og at instrumentet registrerer på FAM (grøn) (**Tabel 4**). Hvis qPCR-programmet er korrekt, kan reagenserne til positiv kontrol være nedbrudte, eller PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay kan ikke være funktionel. Hvis du ikke kan finde rodårsagen til problemet, bedes du kontakte PentaBase A/S eller din lokale distributør for support.
3. Beregn ΔCt for hver prøve med en gyldig eller borderline Ct-værdi$_{(referenceassay)}$ (**Tabel 6**).

7.3 Fortolkning af resultater

Bestemmelsen af MYD88 L265P-mutational status er baseret på de grønne kanal Ct og beregnede ΔCt-værdier, som beskrevet i **Tabel 7**.

1. Hvis den grønne kanals Ct$_{(mutations\ specifikt\ assay)}$ er lig med eller lavere end 39, og ΔCt er lig med eller under 9, påvises MYD88 L265P-mutationen (**Tabel 7**).
2. Hvis Ct$_{(mutations\ specifikt\ assay)}$ er lig med eller lavere end 39, og ΔCt er over 9, eller hvis Ct$_{(mutations\ specifikt\ assay)}$ er over 39, påvises MYD88 L265P-mutationen ikke.

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

Tabel 6. Fortolkning af MYD88 L265P mutation status baseret på den grønne kanals Ct- og ΔCt-værdier for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay.

Ct		ΔCt	Fortolkning	Kommentar
Reference assay (Rør A)	Mutations specifikt assay (Rør B)			
Ct < 25	Alle	Alle	Ugyldig	Mængden af tilført DNA er for høj, hvilket kan påvirke testens ydeevne. Analysen bør gentages med en lavere mængde tilført DNA.
25 ≤ Ct ≤ 30	≤ 39	≤ 9	MYD88 L265P mutation detekteret	Mængden af tilført DNA er optimal for mutationsanalyse.
		> 9	MYD88 L265P mutation ikke detekteret	
	> 39	NA	MYD88 L265P mutation ikke detekteret	
30 < Ct ≤ 36	≤ 39	≤ 9	MYD88 L265P mutation detekteret	Mængden af tilført DNA er lavere end anbefalet. Dette påvirker sensitiviteten. *Hvis MYD88 L265P-mutationen ikke påvises, bør analysen om muligt gentages med en større mængde indsat DNA.
	> 39	> 9	MYD88 L265P mutation ikke detekteret*	
Ct > 36	Alle	Alle	Ugyldig	Mængden af tilført DNA er for lav. Analysen bør gentages med en større mængde indsat DNA.

7.3.1 Intern kontrol analyse

I reaktioner med ingen eller sen amplifikation ved PentaGreen™-mærket assay (reference eller mutations specifikt assay, grøn kanal), bør det bekræftes, at templaten er tilsat og/eller amplifikation har fundet sted ved at undersøge fluorescensen fra PentaYellow™-mærket intern kontrol assay (gul kanal). For at indstille tærsklen for intern kontrol assayet skal du vælge den gule kanal og gentage trinnene i afsnit 7.1.

BEMÆRK: Intern kontrol assayet indeholder suboptimale primerkoncentrationer, og amplifikationen kan hæmmes af amplifikationen ved PentaGreen™-mærket assay i samme reaktion. Derfor er Ct-værdien af intern kontrol-assayet kun vejledende for mængden af template tilsat til reaktionen og kan ikke bruges til præcis kvantificering af DNA. Se afsnit 7.3 for detaljer vedrørende manglende signal fra intern kontrol.

7.3.2 Ugyldige reference og intern kontrol resultater

7.3.2.1 Ingen reference signaler

Hvis der ikke er signal fra referenceassayet i hverken den grønne eller gule kanal, indikerer det, at der er anvendt en lav mængde gDNA eller gDNA af lav kvalitet. Hvis signalet også er fraværende (eller Ct er højere end 39) i det mutations specifikke assay, bør oprensningen af gDNA og/eller PCR-analysen udføres igen.

7.3.2.2 Ingen intern kontrol signaler

Hvis der ikke er signal fra intern kontrol assayet, skal du sikre dig, at PCR-programmet er defineret korrekt, og at det udsendte lys registreres på FAM/SYBR (grøn) og HEX/VIC®/TET (gul) kanalerne (**Tabel 4**). Manglende intern kontrol signal angiver, at der ikke har været nogen amplifikation. Dette kan skyldes en lav mængde eller lav kvalitet af gDNA eller

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

tilstedeværelsen af PCR-hæmmere. Manglende intern kontrol signal udgør kun et problem, hvis der heller ikke er signal på den grønne kanal (reference- og/eller mutations specifikt assay) i den specifikke PCR-reaktionstube. Gentag PCR'en med en højere kvalitet af gDNA. Hvis der er et signal på referenceassayet (i den grønne kanal) med Ct < 30, men ingen signal i intern kontrol af det mutations specifikke assay, kan der være en PCR-hæmmer til stede i prøven. Forsøg at fortynde gDNA'en fem gange og gentag PCR'en.

7.3.3 Estimering af mutationsfrekvens

PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er en semi-kvantitativ test, der kan bruges til at estimere mutationsfrekvensen af den angivne MYD88 L265P-mutation. Mutationsfrekvensen i % beskrives som:

$$Estimeret\ mutationsfrekvens = \frac{1}{2^{(\Delta Ct)}} \cdot 100\%$$

Et eksempel vises nedenfor:

1. Udregning af ΔCt når $Ct_{(reference\ assay)} = 31{,}3$ og $Ct_{(mutationspecific\ assay)} = 34{,}7$:

$$\Delta Ct = Ct_{(mutationspecific\ assay)} - Ct_{(reference\ assay)} = 34{,}7 - 31{,}3 = 3{,}4$$

2. Udregning af estimeret mutationsfrekvens:

$$Estimeret\ mutationsfrekvens = \frac{1}{2^{(\Delta Ct)}} \cdot 100\% = \frac{1}{2^{(3{,}4)}} \cdot 100\% = 9{,}5\%$$

8 Performance evaluering

8.1 Analytisk sensitivitet

Evaluering af den analytiske sensitivitet for både fuldblods- og FFPE-prøver blev udført på BaseTyper™-instrumentet (48-brønds blok med 4-kanals detektion). Derudover blev den analytiske sensitivitet af fuldblodsprøver udført på CFX96 Touch (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™), Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems) og LightCycler® 480 II (Roche) real-time PCR-instrumenter.

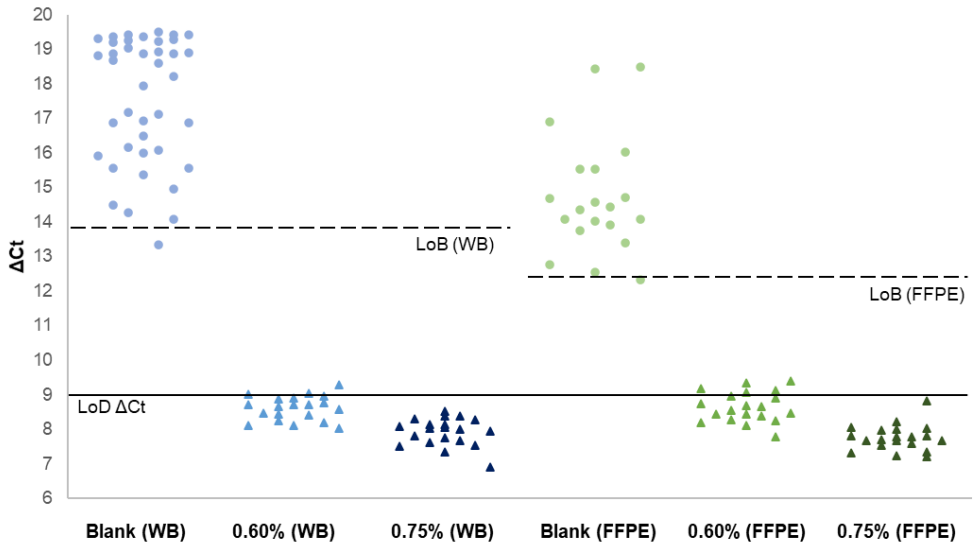
8.1.1 Limit of Blank

Limit of blank (LoB) for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay blev fastsat til ΔCt = 13,8 og ΔCt = 12,4 i henholdsvis fuldblods- og FFPE-prøver ved brug af BaseTyper™-instrumentet (**Figur 3**). LoB blev fastlagt ved brug af ekstraheret gDNA fra henholdsvis 40 og 20 replikater af humane fuldblods- og FFPE-vildtypevævsprøver ved en samlet mængde på 50 ng pr. reaktion. Derudover blev LoB for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay fastsat til ΔCt = 13,2, ΔCt = 16,8, ΔCt = 13,8 og ΔCt = 16,0 på henholdsvis CFX96 Touch, QuantStudio™ 5, Mic qPCR Cycler og LightCycler® 480 II real-time PCR-instrumenter ved brug af 20 replikater af 50 ng fuldblod vildtype gDNA (**Tabel 8**). Fuldblodsreplikaterne var baseret på to fuldblodsprøver, og FFPE-replikaterne var baseret på tre FFPE-prøver.

8.1.2 Limit of Detection

Limit of Detection (LoD) blev fastsat til 0,60% i fuldblod med et 95% konfidensniveau ved brug af BaseTyper™-instrumentet. LoD blev evalueret ved hjælp af 20 replikater bestående af syntetisk MYD88 L265P (Twist Bioscience), der blev spiket ind i en 50 ng vildtype humane gDNA-baggrund, ekstraheret fra fuldblod. Dette blev også fastslået som kvantificeringsgrænsen for fuldblod. PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay detekterede 19 ud af 20 replikater af ekstraheret gDNA fra fuldblod. LoD for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay, når der blev brugt gDNA fra FFPE-væv, blev fastsat til 0,75% med et 95% konfidensniveau ved brug af 20 replikater bestående af MYD88 L265P spiket ind i en 40 ng vildtype humane gDNA-baggrund, ekstraheret fra FFPE (Figur 3) og analyseret på BaseTyper™ Real-Time PCR Instrumentet. Dette blev også fastslået som kvantificeringsgrænsen for FFPE. Desuden var LoD for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay 0,85% med et 95% konfidensniveau på CFX96 Touch, QuantStudio™ 5, Mic qPCR Cycler og LightCycler® 480 II real-time PCR-instrumenter ved brug af 20 replikater af 50 ng fuldblod vildtype gDNA (**Tabel 8**). Fuldblodsreplikaterne var baseret på to fuldblodsprøver, og FFPE-replikaterne var baseret på tre FFPE-prøver.

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com



Figur 3. Venstre side: ΔCt-værdier for 40 replikater af den blanke prøve (blå prikker) og 20 replikater af både 0,60% og 0,75% MYD88 L265P-muterede prøver (lyseblå og mørkeblå trekanter) for humane gDNA ekstraheret fra fuldblod (WB). LoD blev fastlagt som 0,60% for ΔCt ≤ 9,0, og LoB ΔCt blev fundet at være 13,8 illustreret af den stiplede sorte linje. 19 ud af 20 replikater af 0,60% prøver har en ΔCt ≤ 9. LoD ΔCt ≤ 9-tærsklen er illustreret af den sorte fulde linje. Højre side: ΔCt-værdier for 20 replikater af den blanke prøve (grønne prikker) og 20 replikater af både 0,60% og 0,75% MYD88 L265P-muterede prøver (lyse og mørkegrønne trekanter) for humane gDNA ekstraheret fra FFPE-væv. LoD blev fastlagt til 0,75% med ΔCt ≤ 9,0, og LoB ΔCt var 12,4 illustreret af den stiplede sorte linje. 20 ud af 20 replikater af 0,75% prøver har en ΔCt ≤ 9 i FFPE-baggrund, mens kun 15 ud af 20 replikater af 0,60% prøver har en ΔCt ≤ 9. Dataene er analyseret ved brug af BaseTyper™ Real-Time PCR Instrumentet.

Tabel 7. Analytisk sensitivitet for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay for fuldblods prøver ved brug af BaseTyper™ real-time PCR-instrumenter.

Analytisk sensitivitet for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay												
	MYD88 L265P koncentration (%) spiked ind i vildtype fuldblod gDNA											
	Blank			0,50%			0,60%			0,75%		
	Replikater ΔCt>9 / Total	LoB ΔCt	Gennemsnit $Ct_{(mut)}$ (PentaGreen™)	Replikater ΔCt≤9 / Total	Gennemsnit ΔCt	Gennemsnit $Ct_{(mut)}$ (PentaGreen™)	Replikater ΔCt≤9 / Total	Gennemsnit ΔCt	Gennemsnit $Ct_{(mut)}$ (PentaGreen™)	Replikater ΔCt≤9 / Total	Gennemsnit ΔCt	Gennemsnit $Ct_{(mut)}$ (PentaGreen™)
BaseTyper™	40 / 40	13,8	40,3	14 / 20	8.9	35,1	19 / 20	8,6	34,5	20 / 20	7,9	34,4

Tabel 8. Analytisk sensitivitet for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay for FFPE prøver ved brug af BaseTyper™ real-time PCR-instrumenter.

Analytisk sensitivitet for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay									
	MYD88 L265P koncentration (%) spiked ind i vildtype FFPE gDNA								
	Blank			0,60%			0,75%		
	Replikater ΔCt>9 / Total	LoB ΔCt	Gennemsnit $Ct_{(mut)}$ (PentaGreen™)	Replikater ΔCt≤9 / Total	Gennemsnit ΔCt	Gennemsnit $Ct_{(mut)}$ (PentaGreen™)	Replikater ΔCt≤9 / Total	Gennemsnit ΔCt	Gennemsnit $Ct_{(mut)}$ (PentaGreen™)
BaseTyper™	20 / 20	12,4	41,4	15 / 20	8,6	35,7	20 / 20	7,8	34,5

8.1.3 Linearitet

Testen viser linearitet fra 0,3% til 30% MYD88 L265P DNA spiket i en 50 ng vildtype humane genomisk DNA-baggrund, ekstraheret fra fuldblod, med en R^2-værdi på 0,997. PCR-effektiviteten var hhv. 114% og 103% for den grønne kanal på referenceassayet og det mutations specifikke assay. Derudover var PCR-effektiviteten hhv. 99% og 92% for den gule kanal på referenceassayet og det mutations specifikke assay.

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

8.2 Analytisk præcision

8.2.1 Within-laboratorie repeterbarhed og reproducerbarhed

Den analytiske præcision blev valideret ved hjælp af within-laboratorium repeterbarhed og reproducerbarhed (**Tabel 10**). Valideringen blev udført af to forskellige personer på fire forskellige dage spredt over to forskellige uger ved brug af fire forskellige BaseTyper™ qPCR-instrumenter og tre forskellige LOTs af PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay. De testede templates var 0%, 2% og 10% MYD88 L265P muteret DNA spiket i 50 ng vildtype gDNA ekstraheret fra fuldblod samt en positiv kontrol. within-laboratorium repeterbarhed blev fastlagt som 3 gentagne ΔCt-varianser (standardafvigelse (SD)) inden for hver kørsel udført i det samme laboratorium. Den 3 gentagne ΔCt-varians var gennemsnittet på tværs af 4 dage, 4 instrumenter og 3 Lots. Inden-laboratorium reproducerbarhed blev fastlagt som den samlede within-laboratorium-varians, når test blev udført på tværs af 4 dage, 4 instrumenter, 3 LOTs og 3 replikater. Både within-laboratorium repeterbarhed og reproducerbarhed viste lav varians inden for acceptområdet angivet i **Tabel 10** for alle fire templates. Dog var SD'en for reproducerbarhed for 0% muteret DNA-templaten kun lige inden for acceptområdet. Den højere SD skyldes varierende ΔCt-værdier for de blanke prøver, ligesom set i LoB-studiet illustreret i **Figur 3**.

Tabel 9. Repeterbarhed og reproducerbarhed for PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay. Standardafvigelsen (SD) er angivet.

Farve	Targets	Gennemsnit (ΔCt)	Repeterbarhed SD	Reproducerbarhed SD
PentaGreen™	0% MYD88 L265P muteret DNA i gDNA baggrund	14,2	1,33	2,5
	2% MYD88 L265P muteret DNA i gDNA baggrund	6,7	0,26	0,26
	10% MYD88 L265P muteret DNA i gDNA baggrund	4,3	0,21	0,35
	MYD88 L265P Positiv Kontrol	2,2	0,51	0,55
Farve	**Targets**	**Gennemsnit (Ct)**	**Repeterbarhed SD**	**Reproducerbarhed SD**
PentaYellow™	0% MYD88 L265P muteret DNA i gDNA baggrund	26,6	0,21	0,48
	2% MYD88 L265P muteret DNA i gDNA baggrund	26,6	0,13	0,34
	10% MYD88 L265P muteret DNA i gDNA baggrund	26,7	0,23	0,38
	MYD88 L265P Positiv Kontrol	29,1	0,38	0,41
Accept interval			≤2	≤2,5

8.3 Analytisk specificitet

En enkelt genetisk variation blev fundet i primer bindingsområdet af MYD88-genet ved analyse i UCSC-databasen, dog er SNP'en meget sjælden (frekvens på 0,005%). Der er ingen grund til at tro, at assayet ikke er specifik for MYD88 L265P-mutationen. Derudover blev der fundet en almindelig SNP i probe bindingsområdet af den interne kontrol. Det blev konkluderet ved wet-lab test, at SNP'en ikke påvirker ydeevnen af den interne kontrol. Primerne blev fundet at være 100% specifikke over for deres målområder ved blasting i NCBI Primer-BLAST, og der blev ikke fundet krydsreaktivitet mellem de to primersæt.

8.4 Klinisk evaluering

Til den kliniske evaluering blev der oprettet en blindet undersøgelse ved brug af 21 fuldblod (WB) og 21 FFPE-matriks replikater spiket med MYD88 L265P DNA (**Tabel 11**). Prøverne blev håndteret af Person 1, der spikede replikaterne til en koncentration af 0% (vildtype), 1%, 5% og 10% MYD88 L265P i en baggrund af 6-10 ng/µL humane gDNA. Prøverne blev overdraget til Person 2, der udførte qPCR. Derefter blev dataene analyseret af Person 3. Hverken Person 2 eller Person 3 havde kendskab til, hvilke replikater der var spiket med MYD88 L265P DNA. PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay identificerede korrekt 42 ud af 42 replikater, hvoraf 18 af replikaterne var vildtypeprøver (6 WB og 12 FFPE replikater), 12 af replikaterne var 1% MYD88 L265P (6 WB og 6 FFPE replikater), 12 af replikaterne var 5% MYD88 L265P (6 WB og 6 FFPE replikater), og endelig var der tre 10% FFPE replikater. Fuldblodsbaggrunden var baseret på en fuldblodsprøve, og FFPE-baggrunden var baseret på to FFPE-prøver.

Tabel 10. Analyserede prøvedata versus faktisk prøvestatus fra en blindet klinisk undersøgelse, der involverer 0% (wt, vildtype), 1%, 5% og 10% MYD88 L265P-spiket fuldblod (WB).

Klinisk performance: Fuldblodsprøver		PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay		
		Muteret	**Vildtype**	**Total**
Prøve	**Muteret**	6	0	6
	Vildtype	0	15	15
	Total	6	15	21
Overordnet overensstemmelse var 21/21 eller 100% (CI95%: 85,5-100%)				
Vildtype overensstemmelse var 15/15 eller 100% (CI95%: 79,6-100%)				
Mutation overensstemmelse var 6/6 eller 100% (CI95%: 61,0-100%)				

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

Tabel 11. Analyserede prøvedata versus faktisk prøvestatus fra en blindet klinisk undersøgelse, der involverer 0% (wt, vildtype), 1%, 5% og 10% MYD88 L265P-spiket FFPE prøver.

Klinisk performance: FFPE prøver		PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay		
		Muteret	**Vildtype**	**Total**
Prøve	**Muteret**	12	0	12
	Vildtype	0	9	9
	Total	12	9	21
Overordnet overensstemmelse var 21/21 eller 100% (CI95%: 85,5-100%)				
Vildtype overensstemmelse var 9/9 eller 100% (CI95%: 70,1-100%)				
Mutation overensstemmelse var 12/12 eller 100% (CI95%: 75,8-100%)				

Tabel 12. Analyserede prøvedata versus faktisk prøvestatus fra en blindet klinisk undersøgelse, der involverer 0% (wt, vildtype), 1%, 5% og 10% MYD88 L265P-spiket FFPE prøver.

Klinisk performance: FFPE og Fuldblod (total)		PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay		
		Muteret	**Vildtype**	**Total**
Prøve	**Muteret**	24	0	24
	Vildtype	0	18	18
	Total	24	18	42
Overordnet overensstemmelse var 42/42 eller 100% (CI95%: 91,6-100%)				
Vildtype overensstemmelse var 18/18 eller 100% (CI95%: 82,4-100%)				
Mutation overensstemmelse var 24/24 eller 100% (CI95%: 86,2-100%)				

9 Begrænsninger

- PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er blevet valideret til brug med MYD88 L265P-spikede fuldblodsprøver og MYD88 L265P-spikede kolorektale FFPE-prøver.
- Forkert indsamling, opbevaring, DNA-ekstraktion, transport eller håndtering af prøven kan medføre fejlagtige testresultater på grund af lav mængde eller dårlig kvalitet af gDNA eller tilstedeværelse af PCR-hæmmere i prøven.
- PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er valideret til brug med 5-50 ng DNA pr. reaktion. Brug af DNA-mængder lavere eller højere end dette kan medføre forkerte testresultater.
- Et negativt testresultat udelukker ikke tilstedeværelsen af muteret DNA på niveauer under assayets påvisningsgrænse.
- PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay er en semi-kvantitativ test, der kun giver en skønsmæssig vurdering af mutationsfrekvensen. Testen er ikke til nøjagtig påvisning af mutationsfrekvens.
- Den interne kontrolprøve indeholder suboptimale primerkoncentrationer, og amplifikation kan hæmmes af amplifikation af PentaGreen™-mærket assay i samme reaktion.

PentaBase A/S | Petersmindevej 1A | DK-5000 Odense C
Tel. +45 36 96 94 96 | info@pentabase.com | www.pentabase.com

10 Symboler

Følgende symboler anvendes ved mærkning af PlentiPlex™ MYD88 Waldenström Lymphoma qPCR Assay.

	Dato/Producentens oprindelsesland	IVD	In vitro diagnostisk medicinsk udstyr
	Mindst holdbar til		Må ikke genanvendes
	Indeholder tilstrækkeligt til <*n*>		Producent
	Temperaturgrænse	CE	CE-mærkning af overensstemmelse; denne enhed er i overensstemmelse med de gældende krav til vurdering af overensstemmelse for et in vitro diagnostisk medicinsk apparat.
	Se de elektronisk tilgængelige brugsanvisninger		

11 Producent og distributører

PentaBase A/S
Petersmindevej 1A
DK-5000 Odense C

Telefonnummer: +45 36 96 94 96
Email: info@pentabase.com
Hjemmeside: www.pentabase.com

For teknisk assistance, kontakt venligst din lokale distributør eller PentaBase A/S. En komplet liste over distributører er tilgængelig på www.pentabase.com.

BEMÆRKNING TIL BRUGERE: Enhver alvorlig hændelse, der er sket i forbindelse med enheden, skal anmeldes til producenten og den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor brugeren og/eller patienten er etableret.