



PlentiPlex™ KIT

Mastocytosis qPCR Assay

In vitro Diagnostisk Assay til Sensitiv Detektion af KIT D816V

Brugsanvisning

Pentabase

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

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

REFERENCE NUMMER

Dispense Ready (DR)
7032 (20 reaktioner)
Ready-to-Use (RTU)
7030 (12 reaktioner)

Version 5.2
Senest revideret: August 2023



Indholdsfortegnelse

1	FORMÅL	3
1.1	BEREGNET BRUGER	3
2	BAGGRUND	3
3	TESTPRINCIPPET	3
3.1	FORKLARING AF ASSAYET	3
3.1.1	<i>HydroEasy® probe</i>	3
3.1.2	<i>SuPrimers™</i>	3
3.1.3	<i>BaseBlockers™</i>	3
3.2	PRODUKT VARIANTER	4
3.3	PRINCIPPET FOR PROCEDUREN	4
3.3.1	<i>Intern kontrol</i>	4
3.3.2	<i>Reference assay</i>	4
3.3.3	<i>Mutations assay</i>	4
4	REAGENSER OG MATERIALER	5
4.1	OPBEVARING	5
4.1.1	<i>Stabilitet under brug</i>	5
4.2	MEDFØLGENDE MATERIALER	5
4.3	MATERIALER OG INSTRUMENTER DER KRÆVES, MEN IKKE MEDFØLGER	5
5	ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER	6
6	HÅNDTERING AF PRØVER	6
6.1	INDSAMLING, TRANSPORT OG OPBEVARING AF PRØVER	6
6.2	PRØVE OPRENSNING	6
7	FREM GANGSMÅDE	7
7.1	DISPENSE READY	7
7.2	READY-TO-USE	7
7.3	REAL-TIME QPCR PROGRAM	7
8	DATA ANALYSE	7
8.1	INDSTILLINGER FOR TÆRSKELVÆRDI OG BASELINE	7
8.1.1	<i>Korrigeret for baseline drift og indstilling af tærskelværdi</i>	8
8.1.2	<i>Verificering af prøve input og gyldighed af kørslen</i>	8
8.1.3	<i>Bestemmelse af mutationsstatus</i>	9
8.1.4	<i>Ugyldige prøver</i>	10
9	PERFORMANCE EVALUERING	11
9.1	ANALYTISK SENSITIVITET	11
9.1.1	<i>Limit of Blank</i>	11
9.1.2	<i>Limit of Detection</i>	11
9.2	KLINISK EVALUERING	11
10	BEGRÆNSNINGER	12
11	SYMBOLER	12
12	PRODUCENT	12

1 Formål

PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er en semi-kvantitativ real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) test, beregnet til *in vitro* diagnose af den genomiske ændring, der resulterer i mutationen fra asparaginsyre til valin i kodon 816 af det humane KIT proto-onkogenreceptor tyrosinkinase (KIT D816V). Prøverne er genomisk DNA (gDNA), der er oprenset fra blodprøver. Resultaterne fra PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er beregnet til identifikation af tilstedeværelsen og/eller mængden af KIT D816V-mutationen som en del af World Health Organization (WHO) diagnostiske kriterier for at assistere ved diagnosen af Mastocytosis.

1.1 Beregnet bruger

PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er beregnet til brug af sundhedsprofessionelle eller kvalificeret laboratoriepersonale, der er instrueret og trænet i teknikkerne for real-time PCR samt dygtige i håndteringen af biologiske prøver. Medicinske interventioner baseret på resultater fra dette produkt kræver medicinsk autorisation.

2 Baggrund

Mastocytosis er en lidelse, der karakteriseres ved vækst og ophobning af neoplastiske mastceller i forskellige organer og mest almindeligt i huden. WHO's kriterier for diagnose af systemisk mastocytose inkluderer identifikation af mindst ét major kriterium samt mindst ét minor kriterium eller identifikation af mindst tre minor kriterier. Det major kriterie for systemisk mastocytose er multifokale tætte infiltrationer af mastceller (≥ 15 mastceller i aggregeringer) i knoglemarvsbiopsier og/eller i sektioner af andre ekstrakutane organ(er). Minor kriterierne er: 1) mere end 25% af alle mastceller er atypiske celler (type I eller type II) på knoglemarvsudstrygninger eller er spindelformede i mastcelleinfiltrater påvist på sektioner af viscerale organer, 2) KIT-punktmutation ved kodon 816 i knoglemarven eller et andet ekstrakutant organ, 3) mastceller i knoglemarv eller blod eller et andet ekstrakutant organ udviser CD2 og/eller CD25, og 4) basal serum tryptase niveau >20 ng/mL (i tilfælde af en ikke-relateret myeloid neoplasi, er punkt 4 ikke gyldigt som et kriterium for systemisk mastocytose)¹. Selvom fraktionen af celler med KIT D816V-mutationen ofte er meget lav ($<0,1\%$ muteret allel), er tilstedeværelsen af den muterede allel godt korreleret med mastocytose.

3 Testprincippet

3.1 Forklaring af assayet

PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay CE IVD kombinerer allelspecifik PCR med PentaBase's nyudviklede og selektive teknologier, der omfatter HydrolEasy®-prober, SuPrimers™ og BaseBlockers™ til specifik og sensitiv amplifikation af targetet. PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er baseret på PentaBases unikke DNA-teknologier (kaldet pentabaser), der er syntetiske DNA-analoger bestående af et fladt heteroaromatisk, hydrofobt molekyle og en linker. De indsættes i oligonukleotider på faste positioner under syntesen af oligonukleotiderne. PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay indeholder både standard oligonukleotider og oligonukleotider modificeret med pentabaser.

3.1.1 HydrolEasy® probe

En HydrolEasy®-probe ligner en standard hydrolyseprobe (også kaldet en TaqMan®-probe²), der er mærket med en fluorofor i 5'-enden og en quencher i 3'-enden, men med tilsætning af pentabaser. HydrolEasy®-prober er baseret på oligonukleotider modificeret med pentabaser, hvilket giver proben en markant forbedret signal/støj-forhold, højere specificitet og højere følsomhed sammenlignet med konventionelle hydrolyseprober. HydrolEasy®-prober i PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er mærket med PentaGreen™ (detekteret på samme kanal som FAM) i kombination med Green Quencher™ eller som PentaYellow™ (detekteret på samme kanal som HEX, VIC^{®3}, TET) i kombination med Yellow Quencher™.

3.1.2 SuPrimers™

SuPrimers™ er standard DNA-primere modificeret med en eller flere pentabaser. Pentabaser i primere kan give øget specificitet, følsomhed og reducere dannelse af primer-dimers.

3.1.3 BaseBlockers™

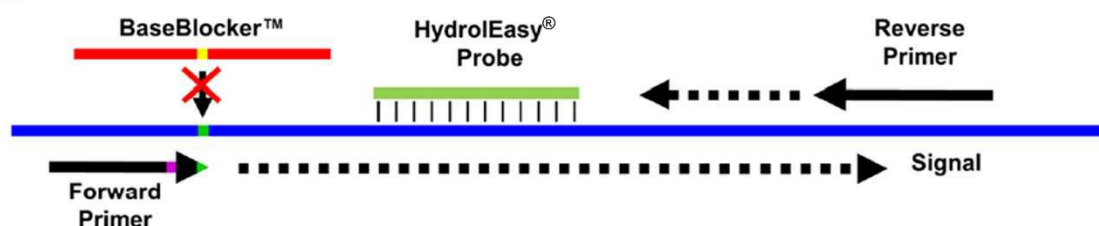
BaseBlockers™ er oligonukleotider modificeret med flere pentabaser, hvilket muliggør specifik og stærk binding til en targetsekvens (**Figur 1**). I PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er BaseBlockers™ designet til at binde til vildtype DNA-target og undertrykke amplifikationen af vildtype DNA ved at hindre bindingen af mutations specifikke primere til vildtype-templatet. Tilstedeværelsen af BaseBlockers™ sikrer høj specificitet og robusthed af assayet. Sammen med SuPrimers™ minimerer BaseBlockers™ risikoen for falske positive signaler.

¹ Valent P, Akin C, Metcalfe DD. (2017). Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. Blood 2017 Mar 16;129(11):1420-1427. DOI: [10.1182/blood-2016-09-731893](https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-731893)

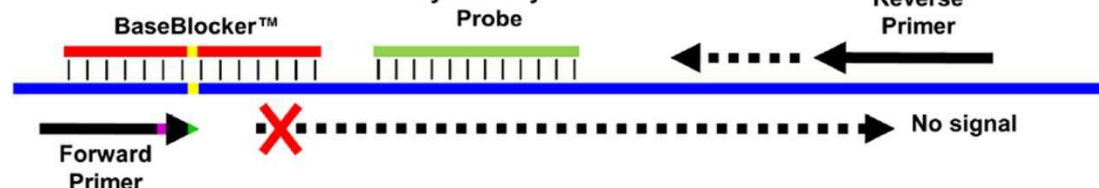
² TaqMan er et registreret varemærke af Roche Molecular Systems, Inc.

³ VIC er et registreret varemærke af Applied Biosystems, Inc.

Mutant allele



Wild-type allele



Figur 1. Illustration af, hvordan BaseBlockers™ fungerer i PlentiPlex™-assays. En BaseBlocker™ binder til og blokerer for amplifikation af vildtype-templaten (modificeret fra Riva et al. 2017⁴). Derimod hæmmer BaseBlocker™ ikke amplifikationen af en template med en enkelt nukleotidmutation, og resultatet er en selektiv amplifikation af muteret DNA i en vildtype-baggrund.

3.2 Produkt varianter

PlentiPlex™ KIT Mastocytosis 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, der skal dispenseres i passende plastbeholdere, før template tilsættes. RTU-versionen er forud dispenseret og kræver kun tilsætning af template før real-time qPCR.

3.3 Princippet for proceduren

3.3.1 Intern kontrol

Der er inkluderet et internt kontrol assay i både reference- og mutation specifikke assays. Den består af en HydrolyEasy®-probe mærket med PentaYellow™ (målt på den samme fluorescenskanal som HEX, VIC® og TET) og et primersæt. Det interne kontrol assay bruges til at vurdere, om template er blevet tilsat, og om amplifikation har fundet sted i reaktioner med negativt signal fra det PentaGreen™ mærkede assay i samme reaktion. Primerne i kontrol assayet er designet til at være ineffektive og er placeret uden for området for alle kendte hyppige mutationer. På denne måde vil det interne kontrol assay have så lidt indflydelse på effektiviteten af reference- og mutation specifikke assays som muligt. Signalet fra det interne kontrol assay kan blive påvirket af positiv amplifikation i reference- og mutation specifikke assays.

3.3.2 Reference assay

Primerne i reference assayet retter sig mod en genomisk region uden kendte sekvensvariationer og bruges til at vurdere mængden af amplificerbart DNA i prøven. Reference assayet indeholder en HydrolyEasy®-probe mærket med PentaGreen™ (målt på samme kanal som FAM), et mutations uafhængigt primersæt og et internt kontrol assay. Reference assayet køres i sit eget rør eller brønd. Fluorescenssignalet fra reference assayet bruges til at beregne tærskelværdien, som igen bruges til at bestemme cyklustærsklen (Ct) for det ønskede assay. Cyklustærsklen for reference assayet er en måling af mængden af amplificerbart DNA i den evaluerede prøve og bruges til beregning af mutations- Δ Ct.

3.3.3 Mutations assay

Det mutation specifikke assay retter sig mod den genomiske region, der indeholder KIT D816V-mutationen (c.2447A>T), og bruges til at bestemme tilstedeværelsen af mutationen i en prøve (**Tabel 1**). Mutations assayet indeholder en HydrolyEasy®-probe mærket med PentaGreen™ (målt på FAM-kanalen), en BaseBlocker™ (for at reducere eller eliminere uspecifik amplifikation af vildtype), et mutation specifikt primersæt og et internt kontrol assay. Ct-værdierne for mutations assayet og den tilsvarende reference bruges til at bestemme, om en prøve er positiv eller negativ for den givne mutation.

Tabel 1. KIT mutation detekteret med PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay.

Assay	CDS mutation	Aminosyre substitution	Cosmic ID
KIT D816V	c.2447A>T	p.Asp816Val (D816V)	COSM1314

⁴ Riva et al., 2017; PMID: 28636636

4 Reagenser og materialer

Materialerne, der følger med PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay, kan findes i **Tabel 2**. Materialer og instrumenter, der kræves, men ikke medfølger, kan findes i **Tabel 3**.

4.1 Opbevaring

Se på etiketten for udløbsdatoen. Gentagen optøning og frysning bør begrænses til et minimum og bør ikke overstige 10 fryse-optø cyklusser.

4.1.1 Stabilitet under brug

Når assayet er i brug, skal komponenterne straks returneres til fryseren efter brug for at minimere tiden ved stuetemperatur og eksponering for lys.

Bortskaf komponenterne i overensstemmelse med dine lokale retningslinjer for bortskaffelse af plastaffald, herunder ikke-farlige PCR-komponenter. Reagenserne må ikke genbruges.

4.2 Medfølgende materialer

Tabel 2. Liste over materialer som følger med PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay og mutationen detekterer med enten Dispense Ready (DR) eller Ready-to-Use (RTU).

Produkt variant	Beskrivelse	Tube nr.		Kit komponenter	Mutation	Indhold
		DR	RTU			
Y1	PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay	1	A	KIT Reference 1	-	Syntetisk DNA
		2	B	KIT Simplex 1	D816V	Syntetisk DNA
		-	C	KIT Simplex 1	D816V	Syntetisk DNA
		-	D	KIT Simplex 1	D816V	Syntetisk DNA
		3	-	AmpliQueen™ qPCR Master Mix	-	qPCR Master Mix

4.3 Materialer og instrumenter der kræves, men ikke medfølger

Materialer og instrumenter, der kræves, men ikke medfølger, er opført i **Tabel 3**. PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er designet til at køre på åbne platforme med mindst to kanaler (grøn og gul). Andre real-time PCR-platforme er sandsynligvis anvendelige, men det anbefales kraftigt, at der udføres en specifik validering ved brug af kliniske prøver og referencekontroller, når der køres på andre instrumenter end dem angivet i **Tabel 3**, for at verificere cyklustærskler og tærskelværdier.

Tabel 3. Materialer og instrumenter der kræves, men ikke medfølger.

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™, PentaBase A/S, Ref.No. 715)
DNA-ekstraktions kit til FFPE prøver (f.eks. Nucleic Acid Extraction Kit for FFPE DNA Extraction, Xi'an TianLong Science and Technology Co., Ltd., distribueret af PentaBase A/S, Ref. No. T165H)
Real-time qPCR instrument
Real-time PCR instrumenter inklusiv: QuantStudio™ (Applied Biosystems), BaseTyper (PentaBase A/S), MyGo Pro (IT-IS Life Science), MIC (Bio Molecular Systems)

5 Advarsler og forholdsregler

- Kun til brug i *in vitro* diagnostik.
- Den mutationelle status bestemt af PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay bør altid vurderes sammen med andre kliniske symptomer og diagnoser ved træffelse af behandlingsbeslutninger.
- God laboratoriepraksis og omhyggelig overholdelse af de angivne procedurer i denne brugsanvisning er nødvendig. Brug laboratorie kittel, laboratoriehandsker og hårbeskyttelse for at undgå forurening. Arbejd i rene miljøer for at undgå forurening.
- Brug ikke reagenser, der er udløbet.
- Brug ikke beskadigede PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay-rør.
- Brug ikke en PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay forud dispenseret i et Ready-to-Use PCR-rør, hvis det er blevet tabt, mens det er åbent.
- Åbn ikke rør eller brønde under eller efter amplifikation efter afslutningen af PCR-programmet.
- Verificer egnetheden af DNA-prøverne, da DNA-prøver kan være ikke-homogene og af varierende kvalitet, hvilket kan påvirke analysen. I tilfælde af mistænkt DNA-degradering anbefales det at verificere DNA-integritet og mængden af amplificerbart DNA ved hjælp af en PCR-baseret metode.
- Det interne kontrol assay indeholder suboptimale primerkoncentrationer, og amplifikationen kan hæmmes af amplifikationen af PentaGreen™ mærket assay i samme reaktion. Derfor er resultatet gyldigt i tilfælde, hvor der kun er amplifikation i den grønne (FAM/SYBR) kanal.
- Vær opmærksom på placering og orientering 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 sent eksponentiel fase, kan føre til falske positive resultater, hvis det ikke rettes.
- Konsulter relevante brugervejledninger for real-time qPCR-instrumenter for yderligere advarsler, forholdsregler og procedurer for at reducere risikoen for forurening.
- Bortskaf brugte PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay-rør, pipettespidser og prøverør i overensstemmelse med lokale, statslige og føderale regler for laboratorie- og plastaffald. Enheden udgør ingen biofare risici.
- Minimer eksponeringen af PlentiPlex™ KIT Mastocytosis 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 assayets ydeevne.
- Udskift ikke reagenserne med andre, da det kan påvirke assayets ydeevne.
- Utilstrækkelig eller upassende prøveindsamling, opbevaring og transport kan resultere i forkerte eller ugyldige resultater.

6 Håndtering af prøver

6.1 Indsamling, transport og opbevaring af prøver

Prøver skal være humant genomisk DNA ekstraheret fra fuldblodsprøver eller lignende. Det anbefales, at fuldblodsprøver indsamles, transporteres, behandles og opbevares i overensstemmelse med ISO 20186-2:2019⁵ for at sikre optimal DNA-kvalitet.

6.2 Prøve oprensning

Ekstraktion af genomisk DNA fra fuldblodsprøver bør udføres ved hjælp af genomisk DNA-ekstraktionskits og/eller procedurer, der er specielt designet til håndtering af fuldblodsprøver i overensstemmelse med producentens anvisninger. Det anbefales at vurdere DNA-integritet og amplificerbarhed ved hjælp af PCR-baserede metoder i overensstemmelse med ISO 20186-2:2019.

⁵ ISO 20186-2:2019 Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for venous whole blood - Part 2: Isolated genomic DNA

7 Fremgangsmåde

Analysér hver prøve med både refererende assay og det mutations-specifikke assay. Disse bør analyseres i den samme PCR-kørsel for at sikre minimal variation. Det mutations-specifikke assay bør køres i triplikater.

7.1 Dispense Ready

1. Tilsæt 12.5 µL AmpliQueen™ qPCR Master Mix til hver PCR-rør (hætteglas, strip eller plade).
2. Tilsæt 7.5 µL af Reference Mix til ét PCR-rør pr. patient.
3. Tilsæt 7.5 µL af Mutant Mix til tre PCR-rør pr. patient.
4. Tilsæt 5 µL ekstraheret DNA (1-40 ng/µL) fra hver prøve til mutations assayet og den tilsvarende reference. Det anbefales at inkludere en NTC (No Template Control) i hver kørsel. Tilsæt nuklease-frit vand til NTC i stedet for DNA.
5. Forsegl alle rør.
Anbefalet trin: Vortex strips kort (2-3 sek.) for at forbedre fjernelse af luftbobler.'
6. Centrifuger PCR-rørene (1-2 minutter ved 4000-5000 rpm.) for at sikre, at alle reagenser samles i bunden af rørene og for at eliminere luftbobler.
7. Placer PCR-rørene i real-time PCR-maskinen og kør det angivne real-time qPCR-program (**Tabel 4**).

7.2 Ready-to-Use

1. Centrifuger PCR-strips (1-2 minutter ved 4000-5000 rpm.) for at sikre, at alle reagenser samles i bunden af rørene og luftbobler elimineres.
2. Tilsæt 5 µL ekstraheret DNA (1-40 ng/µL) fra hver prøve til referencebrønden og til de tre brønde med mutation assay. Det anbefales at inkludere en NTC (No Template Control) i hver kørsel. Tilsæt nuklease-frit vand til NTC i stedet for DNA.
3. Forsegl alle rør.
Anbefalet trin: Vortex strips kort (2-3 sek.) for at forbedre fjernelse af luftbobler.'
4. Centrifuger PCR-rørene (1-2 minutter ved 4000-5000 omdrejninger pr. minut) for at sikre, at alle reagenser samles i bunden af rørene og luftbobler elimineres.
5. Placer PCR-rørene i real-time PCR-maskinen og kør real-time qPCR-programmet (**Tabel 4**).

7.3 Real-time qPCR program

Tabel 4. Real-time qPCR program til kørsel af PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay.

Protokol	Temperature [°C]	Tid [sek]	Ramping (°C/s)	Cyklusser	Kannel
Fase 1					
Hold	95	120	-	-	
Fase 2 (1-45)					
Amplifikation	94	15	1.6	45	FAM/SYBR (grøn) HEX/VIC®/TET (gul)
	60	40	1.6		

8 Data Analyse

8.1 Indstillinger for tærskelværdi og baseline

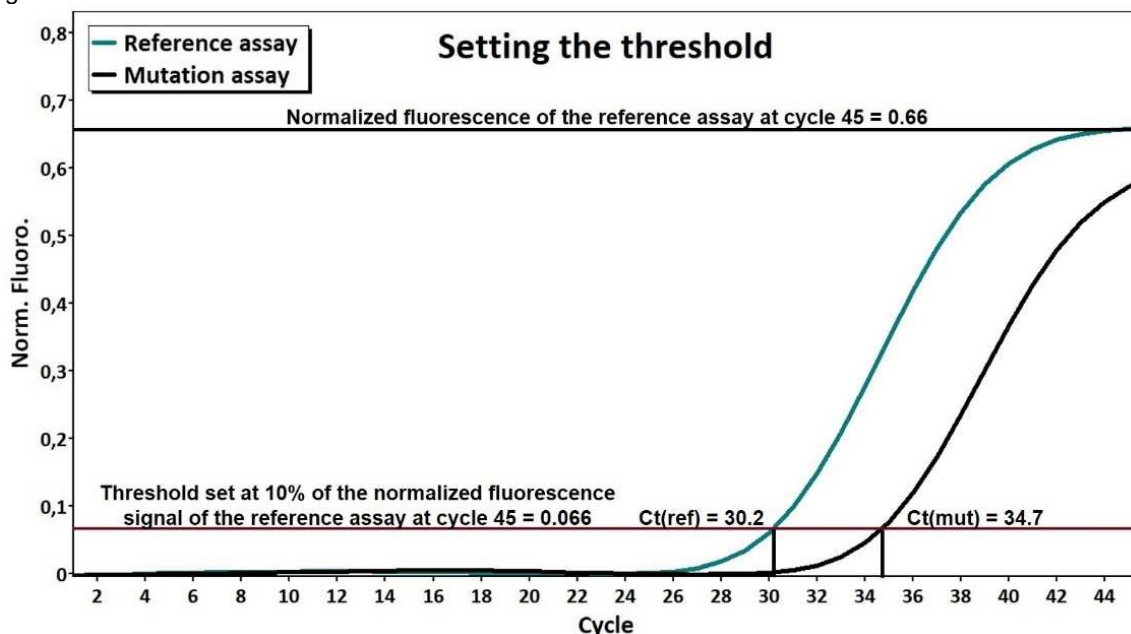
Dataanalysen for PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR-analysen involverer bestemmelse af cyklustærsklen (Ct). Ct defineres som cyklusen, hvor fluorescenssignalet for en given analyse overskrider tærskelværdien, der er fastsat som en del af analyseproceduren. Ct-værdien afspejler mængden af amplificerbart target DNA til stede i prøven. Tærskelværdien bør indstilles til 10% af reference assayets (Rør A) fluorescenssignal ved cyklus 45 for hver prøve (**Figur 2**). Tærskelværdien skal indstilles for hver kanal individuelt. Mutationsanalysen udføres i den grønne (FAM) kanal, og intern kontrolanalysen udføres i den gule (HEX/VIC) kanal.

Inden tærskelværdien indstilles, og Ct-værdierne beregnes, er det vigtigt at korrigerer for eventuelle baseline drift eller svingninger, så den normaliserede baseline eller baggrundfluorescens 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 baselinen. Dette inkluderer hældningskorrektur, kurvetilpasning, indstilling af et baselinens cyklusinterval og ignorering af de første cyklusser i kørslen. Hvis venligst til instrument-specifikke retningslinjer for specifikke instruktioner, når de er tilgængelige, eller kontakt PentaBase A/S eller din lokale distributør for teknisk hjælp.

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

I tilfælde, hvor det ikke er muligt at justere den normaliserede baggrundfluorescens til nul, skal værdien af baggrundfluorescens ved cyklus 20 lægges til tærskelværdien, der er beregnet ved at tage 10 % af referencesignalet 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.

8.1.1 Korrigerings for baseline drift og indstilling af tærskelværdi

1. Brug hældningskorrektur/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 baselinefluorescens ved cyklus 20 til tærskelværdien (Tabel 5).

Tabel 5. Indstilling af tærskelværdien i tilfælde, hvor baggrunds fluorescens er over 0.

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

8.1.2 Verificering af prøve input og gyldighed af kørslen

Før mutationsstatus af de undersøgte prøver bestemmes, bør prøve input og kørselens gyldighed verificeres.

1. Verificér, at de grønne kanal Ct-værdier for reference assayet (Rør A) for alle prøver er gyldige i henhold til Tabel 6.
2. Hvis NTC-prøver er inkluderet i kørslen, skal det verificeres, at de grønne og gule kanal Ct-værdier for reference assayet (Rør A) er > 38, og at de grønne og gule kanal Ct-værdier for det mutation specifikke assay (Rør B-D) er > 45 for de inkluderede NTC'er. Kørsler med NTC Ct-værdier på eller under disse grænser indikerer forurening, og resultaterne af hele kørslen bør anses som ugyldige. Find årsagen til forureningen ved at kontrollere eller erstatte alle potentielle kilder til forurening, såsom pipetter og instrumenter. Hvis forureningen ikke kan lokaliseres, kontakt PentaBase A/S eller din lokale distributør.

Tabel 6. Acceptable grøn kanals Ct-værdier for reference assayet.

Reference assay Ct	Fortolkning	Kommentar
Ct < 23	Ikke gyldig	Mængden af input DNA er for høj, hvilket kan påvirke performance af assayet. Analysen bør gentages med en lavere mængde input DNA.
23 ≤ Ct ≤ 32	Gyldig	Mængden af input DNA er optimal for mutationsanalyse.
Ct > 32	Ikke optimal	Mængden af input DNA er lav. Hvis prøven er negativ for mutationen, bør analysen gentages med en højere mængde input DNA, hvis det er muligt, da et reduceret antal kopier af gDNA analyseres, hvilket medfører en betydelig risiko for falske negative.

8.1.3 Bestemmelse af mutationsstatus

Bestemmelse af mutationsstatus baseres på en kombination af replikat Ct-værdier for mutationsanalysen og gennemsnittet af beregnede ΔCt -værdier, som beskrevet nedenfor:

1. Analyser mutation assayets replikationer (grøn kanal) mod den tilsvarende reference for én prøve ad gangen.
2. Indstil tærsklen til 10% af referencesignalstyrken ved cyklus 45, som beskrevet i afsnit 8.1.2 (**Figur 2**).
3. Aflæs Ct-værdien for hver af mutation assayets replikater (Rør B-D).
4. For replikater med Ct < 44, beregn gennemsnitlig ΔCt (se **Tabel 7** for eksempler) for de to replikater med de laveste Ct-værdier:

$$\Delta Ct_{\text{Replikat 1 med Ct} < 44} = Ct_{(\text{Replikat 1 med Ct} < 44)} - Ct_{(\text{Reference assay})}$$

$$\Delta Ct_{\text{Replikat 2 med Ct} < 44} = Ct_{(\text{Replikat 2 med Ct} < 44)} - Ct_{(\text{Reference assay})}$$

$$\text{gennemsnit } \Delta Ct = \frac{\Delta Ct_{(\text{Replikat 1})} + \Delta Ct_{(\text{Replikat 2})}}{2}$$

Derfor, hvis alle 3 replikater har Ct-værdier < 44, bør kun de to replikater med de laveste Ct-værdier bruges til at beregne gennemsnittet af ΔCt -værdien. Således for:

$$Ct_{(\text{Replikat 1 med Ct} < 44)} < Ct_{(\text{Replikat 2 med Ct} < 44)} < Ct_{(\text{Replikat 3 med Ct} < 44)},$$

bruges kun replikat 1 og replikat 2's Ct-værdier til at beregne gennemsnittet af ΔCt -værdien.

Tabel 7. PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay mutationsstatus beregning.

Prøve	Reference Ct	Mutation specifikt assay						Replikater med Ct < 44	Gennemsnit ΔCt	Konklusion
		Replikat								
		1		2		3				
Ct	ΔCt	Ct	ΔCt	Ct	ΔCt					
1	27,00	41	14	40	13	43	16	3	$\frac{14+13}{2} = 13,50$	KIT D816V mutation positive
2	26,00	42	16	41	15	43	17	3	$\frac{16+15}{2} = 15,50$	Sample does not fulfil criteria for KIT D816V mutation (Mean $\Delta Ct > 15$)
3	31,00	41	10	45	14	ND	NA	1	NA	Sample does not fulfil criteria for KIT D816V mutation (only 1 replicate with Ct < 44)
4	31,00	45	14	43	12	39	8	2	$\frac{12+8}{2} = 10$	KIT D816V mutation positive

8.1.3.1 Fortolkning af mutationsstatus

Prøver er positive for KIT D816V-mutationen, når reference assayets Ct-værdi er gyldig, Ct-værdierne for mindst to replikater af mutation assayet er < 44, og gennemsnittet af Δ Ct for replikaterne med de to laveste Ct-værdier i mutation assayet er < 15 (**Tabel 8** og eksempler i **Tabel 7**).

Tabel 8. Bestemmelse af KIT D816V mutationsstatus baseret på grøn kanals Ct- og Δ Ct-værdier i PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay. * Δ Ct-værdier refererer til gennemsnittet af to replikaters værdier for det mutation specifikke assay fratrukket Ct-værdien for det tilsvarende reference assay.

Ct		Gennemsnit Δ Ct	Fortolkning	Kommentarer
Reference assay (Rør A)	Mutation specifikt assay (Rør B-D)			
< 23	Alle	Alle	Ikke gyldig	Mængden af input DNA er for høj, hvilket kan påvirke analysens præstation. Analysen bør gentages med en lavere mængde input DNA.
23 ≤ Ct ≤ 32	< 44 (mindst to replikater)	< 15*	KIT D816V mutation detekteret	Mængden af input DNA er optimal for mutationsanalyse.
	≥ 44 (mindst to replikater)	Any	KIT D816V mutation ikke detekteret	
Ct > 32	< 44 (mindst to replikater)	< 15*	KIT D816V mutation detekteret	
	≥ 44 (mindst to replikater)	≥ 15*	KIT D816V mutation ikke detekteret [^]	Mængden af input DNA er lavere end anbefalet, hvilket påvirker følsomheden. [^] Hvis KIT D816V-mutationen ikke detekteres, bør analysen, hvis det er muligt, gentages med en højere mængde input DNA.

8.1.3.2 Intern kontrol analyse

I reaktioner uden eller med sen amplifikation ved PentaGreen™-mærket assay (reference- eller mutation specifikt assay, grøn kanal), bør det valideres, at template er blevet 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, vælg den gule kanal og gentag trinnene i afsnit 8.1.1.

BEMÆRK: Intern kontrol assayet indeholder suboptimale koncentrationer af primere, og amplifikationen kan hæmmes af amplifikationen ved PentaGreen™-mærket assay i samme reaktion. Derfor er Ct-værdien af det interne kontrol assay kun indikativ for mængden af template, der er tilsat reaktionen, og kan ikke bruges til præcis kvantificering af DNA. Se afsnit 8.1.4.2 for detaljer vedrørende manglende signal fra intern kontrol.

8.1.4 Ugyldige prøver

8.1.4.1 Ingen referencesignal

Tilfælde, hvor der ikke er signal fra reference assayet hverken i den grønne eller gule kanal, indikerer, at der er blevet anvendt en lav mængde eller lav kvalitet af DNA, at der er PCR-hæmmere til stede i prøven, eller at PCR-programmet er forkert. Sørg for, at qPCR-programmet er defineret korrekt, og at instrumentet opsamler signaler i FAM/SYBR (grøn) og HEX/VIC®/TET (gul) kanalerne (**Tabel 4**). Hvis der ikke er signal i mutation specifikt assay heller ikke, bør DNA oprensningen gentages. Hvis der observeres signal i nogle af de mutation specifikke assays, bør prøven køres igen ved brug af den samme ekstraktion af DNA.

8.1.4.2 Ingen intern kontrol signal

Hvis der ikke opstår signal fra intern kontrol assayet, skal du sikre dig, at qPCR-programmet er defineret korrekt, og at instrumentet opsamler signaler i FAM/SYBR (grøn) og HEX/VIC®/TET (gul) kanalerne (**Tabel 4**). Manglende signal fra intern kontrol indikerer, at der ikke har fundet amplifikation sted. Dette kan skyldes lav mængde eller lav kvalitet af DNA eller tilstedeværelsen af PCR-hæmmere. **BEMÆRK:** Manglende signal fra intern kontrol er kun et problem, hvis der heller ikke er signal i den grønne kanal (reference- og/eller mutation specifikt assay) i den specifikke PCR-reaktion. Således, hvis der er signal i den grønne kanal i det specifikke PCR-rør uden intern kontrol-signal, er resultatet gyldigt. Hvis der heller ikke er signal i den grønne kanal, bør DNA oprensningen gentages, og analysen bør udføres igen.

8.1.4.3 Signal i NTC

Hvis NTC-prøver er inkluderet i kørslen, skal du verificere, at de grønne og gule kanal Ct-værdier for reference assayet (Rør A) er > 38, og at de grønne og gule kanal Ct-værdier for det mutation specifikke assay (Rør B-D) er > 45 for de inkluderede NTC'er. Kørsler med NTC Ct-værdier under disse grænser indikerer forurening, og resultaterne af hele kørslen

bør anses som ugyldige. Find årsagen til forureningen ved at kontrollere eller erstatte alle potentielle kilder til forurening, såsom pipetter og instrumenter. Hvis forureningen ikke kan lokaliseres, kontakt PentaBase A/S eller din lokale distributør.

9 Performance evaluering

9.1 Analytisk sensitivitet

9.1.1 Limit of Blank

Specificiteten og performance af PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay i fravær af template er etableret og evalueret under validering af assayet og bliver vurderet under kvalitetskontrol af producerede partier ved brug af 200 ng vildtype (WT) humant genomisk DNA og PCR-grade vand, henholdsvis. Kriterierne for godkendelse af assayene er $Ct_{(200\text{ ng WT})} > 45$ og $\Delta Ct_{(200\text{ ng WT})} > 20$ i 4 ud af 6 replikationer.

9.1.2 Limit of Detection

Den analytiske sensitivitet af PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er blevet evalueret ved sammenligning med en metode (MastOUH-assay) udviklet af Mastocytosis Centre på Odense Universitetshospital (MastOUH) (MastOUH-assay) og offentliggjort i en række artikler (Kristensen et al. 2011⁶, Kristensen et al. 2014⁷, Kristensen et al. 2017⁸, Kristensen et al. 2019⁹). PCR-effektiviteten af PlentiPlex™ Mastocytosis CE IVD assay blev fundet at være identisk med MastOUH assayets PCR-effektivitet på 94% for mutation specifikt assay og 100% for reference assayet, som tidligere blev karakteriseret ved brug af firefoldige fortyndinger af KIT D816V mutations-positivt DNA i vildtype-DNA (Kristensen et al. 2011). Den resulterende ikke-kliniske limit of detection er 0,01% KIT D816V-positive alleler, når ΔCt -cutoff er sat til 15 (Kristensen et al. 2020¹⁰).

9.2 Klinisk evaluering

Den kliniske specificitet og sensitivitet af PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er blevet sammenlignet med MastOUH-assayens standardprotokol (uden genanalyse) ved at analysere DNA fra 58 kontrolprøver fra raske bloddonorer samt DNA fra 115 kliniske opfølgingsblodprøver fra kendte KIT D816V mutationspositive MastOUH-patienter (D816V tidligere påvist i knoglemarv, hud og/eller blod) (Tabel 9). Analysen blev udført ved hjælp af de samme DNA-ekstraktioner og i overensstemmelse med producentens anbefalinger (PentaBase-assay teknologi og protokol beskrevet detaljeret i producentens 'brugsanvisning') ved hjælp af QuantStudio™ 12K-instrumentet (Applied Biosystems) (Kristensen et al. 2020).

Den beregnede KIT D816V allelbyrde for PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay viste sig at være meget ens med MastOUH-assayen (N=84, P<0.001, R = 98) og viser dermed en lignende klinisk PCR-effektivitet som MastOUH-assayet og en klinisk limi of detection på 0.01% (Kristensen et al. 2020).

Tabel 9. Klinisk performance af PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay.

Klinisk performance: Fuldbloodsprøver		PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay		
		KIT D816V Positiv	KIT D816V Negativ	Total
MastOUH Assay Standard protokol	KIT D816V Positiv	84	5	89
	KIT D816V Negativ	0	58	58
	Total	84	63	147
Overordnet overensstemmelse var 142/147 eller 92,3% (CI95%: 92,3-98,5%)				
Vildtype overensstemmelse var 58/63 eller 92,1% (CI95%: 82,7-95,6%)				
Mutation overensstemmelse var 84/89 eller 94,4% (CI95%: 87,5-97,6%)				

⁶ 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 13:180-8. DOI: [10.1016/j.jmoldx.2010.10.004](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.10.004)

⁷ Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Møller MB, Broesby-Olsen S. Sensitive KIT D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. Am J Hematol 2014 89:493-8. DOI: [10.1002/ajh.23672](https://doi.org/10.1002/ajh.23672)

⁸ Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Mortz CG, Kjaer HF, Ollert M, Møller MB, Broesby-Olsen S. Prospective evaluation of the diagnostic value of sensitive KIT D816V mutation analysis of blood in adults with suspected systemic mastocytosis. Allergy 2017 72:1737-43. DOI: [10.1111/all.13187](https://doi.org/10.1111/all.13187)

⁹ Kristensen T, Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Mortz CG, Kjaer HF, Møller MB; Mastocytosis Centre Odense University Hospital (MastOUH). Towards rational diagnostics in mastocytosis: clinical validation of sensitive KIT D816V mutation analysis of unfractionated whole-blood. Leuk Lymphoma 2019 60:268-70. □ DOI: [10.1080/10428194.2018.1460475](https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1460475)

¹⁰ Kristensen T, Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Mortz CG, Kjaer HF, Møller MB; Mastocytosis Centre Odense University Hospital (MastOUH). Towards rational diagnostics in mastocytosis: clinical validation of sensitive KIT D816V mutation analysis of unfractionated whole-blood. Leuk Lymphoma 2019 60:268-70. □ DOI: [10.1080/10428194.2018.1460475](https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1460475)

10 Begrænsninger

- PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er kun blevet valideret til brug med fuldblodsprøver.
- Forkert indsamling, opbevaring, DNA-ekstraktion, transport eller håndtering af prøven kan forårsage falske testresultater på grund af lav mængde eller dårlig kvalitet af DNA eller tilstedeværelse af PCR-hæmmere i prøven.
- PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er valideret til brug med 5-200 ng DNA pr. reaktion. Brug af DNA-mængder lavere eller højere end dette kan føre til ukorrekte testresultater. Et negativt testresultat udelukker ikke tilstedeværelsen af muteret DNA på niveauer under assayens påvisningsgrænse.
- Sjældne mutationer inden for de genomiske DNA-områder af KIT-genet dækket af de oligonukleotider, der anvendes i PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay, kan hæmme påvisningen af den angivne KIT D816V-mutation.
- PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er en semi-kvantitativ test, der kun vil give et skøn over mutationsfrekvensen. Testen er ikke til præcis påvisning af mutationsfrekvensen.
- Ct-værdien af intern kontrol assayet er kun indikativ for mængden af template tilsat reaktionen og kan ikke bruges til præcis kvantificering af DNA.
- PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay er ikke kompatibel med LightCycler® 96 Systemet (Roche).

11 Symboler

De følgende symboler er anvendt ved mærkning af PlentiPlex™ KIT Mastocytosis qPCR Assay.



Dato/Producentens oprindelsesland



In vitro diagnostisk medicinsk udstyr



Mindst holdbar til



Må ikke genanvendes



Indeholder tilstrækkeligt til <n>



Producent



Temperaturgrænse



CE-mærkning af overensstemmelse; denne enhed er i overensstemmelse med de gældende krav for CR for *in vitro* diagnostisk medicinsk udstyr



Se de elektronisk tilgængelige brugsanvisninger

12 Producent

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.