

Caratteristiche prestazionali

QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit, Versione 1 **REF** 60404

Gestione delle versioni

Il presente è il documento Caratteristiche prestazionali del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue, Versione 1, R3.

  	Prima di eseguire i test, verificare l'eventuale disponibilità di nuove revisioni delle etichette elettroniche sulla pagina web www.qiagen.com/HB-0414 . Lo stato della revisione è indicato dalla data di rilascio (formato: mese/anno).
---	---

Analisi a valle

Il DNA genomico eluito è pronto per essere utilizzato in diverse analisi a valle, inclusa una grande varietà di analisi di diagnostica in vitro a valle. Per maggiori informazioni riguardo le prestazioni del sistema specifico, fare riferimento al manuale del kit QIAGEN pertinente.

Resa del DNA purificato

I campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) possono presentare un alto grado di eterogeneità dei tessuti. Inoltre, nei campioni FFPE l'area superficiale dei tessuti è molto variabile, il che comporta una variabilità della quantità di DNA estratto. Pertanto, l'utente deve ottimizzare il numero, lo spessore e l'area superficiale delle sezioni per il proprio campione di interesse e per ogni procedura utilizzata nel proprio laboratorio.

Se il kit viene utilizzato unitamente a un'applicazione QIAGEN a valle, fare riferimento al relativo manuale per le istruzioni.

Un'insufficiente disidratazione dei tessuti durante la preparazione dei tessuti FFPE, l'aggiunta di una quantità eccessiva di paraffina con il campione nella provetta di estrazione, l'utilizzo di

etanolo con un grado di purezza inferiore rispetto a quello raccomandato (cioè non con grado di purezza per la biologia molecolare) o il persistere nel campione di residui di xilene o etanolo può comportare un'estrazione inferiore a quella ottimale e una bassa quantità di DNA.

Ripetibilità

La ripetibilità è stata valutata utilizzando sei linee di cellule FFPE generate da cellule umane fissate in formalina e incluse in paraffina. I campioni sono stati testati con QuantiTect® SYBR® Green Mastermix e primer della β -actina gene-specifici utilizzando il ciclatore per PCR in tempo reale Rotor-Gene® Q. Le reazioni di PCR sono state effettuate per un frammento da 174 bp e per un frammento da 218 bp del gene della β -actina umano.

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati 72 punti dati per ogni dimensione di frammento. L'analisi statistica ha incluso il calcolo della deviazione standard (standard deviation, SD) e i limiti superiore e inferiore di confidenza al 95%. La variazione è stata stimata utilizzando l'analisi della componente della varianza come deviazione standard per il frammento da 218 bp (SD: 0,342 C_T ; limite inferiore di confidenza al 95%: 0,291; limite superiore di confidenza al 95%: 0,413). Questo risultato può essere utilizzato come stima della ripetibilità per il processo di estrazione. La variazione stimata per il frammento da 174 bp è stata di 0,258 C_T ; limite inferiore di confidenza al 95%: 0,220; limite superiore di confidenza al 95%: 0,312.

Riproducibilità

La valutazione della riproducibilità è stata effettuata su tre laboratori utilizzando tre campioni FFPE clinici contenenti tessuto di carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC, non-small cell lung cancer): uno presentava una mutazione 6223 di delezione, uno presentava una mutazione L858R e uno era un ceppo selvatico (wild-type, WT). I campioni FFPE clinici sono stati selezionati sulla base del loro stato di mutazione noto secondo la sequenza di Sanger.

Per ognuno dei campioni FFPE clinici mutanti, 48 sezioni FFPE sequenziali sono state randomizzate a coppie per essere utilizzate in un'estrazione e divise in tre lotti, uno per ogni sito.

Estrazioni sono state effettuate in duplicato per ogni sito di test. Ogni sito ha utilizzato per l'estrazione un unico lotto di kit QIAamp FFPE DNA DSP. La valutazione dei campioni e la valutazione delle mutazioni sono state effettuate utilizzando il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR nei tre siti. I campioni sono stati testati in tre giorni non consecutivi nell'arco di sei giorni. Ogni campione è stato testato sei volte in ognuno dei siti per un totale di 18 punti dati per campione.

Per tutti i campioni, sull'insieme dei tre siti, è stato dimostrato correttamente il 100% dei mutation call.

Linearità

Il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue può essere utilizzato per l'isolamento del DNA da diversi tipi di tessuti. Occorre stabilire un intervallo lineare sulla base dei requisiti del cliente e validarlo per quell'uso particolare. Si attendono intervalli lineari differenti per diversi tipi di tessuti, a seconda del carico di tessuto inserito nel sistema nonché delle caratteristiche del tessuto.

Sostanze interferenti

Il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue può essere utilizzato per l'isolamento del DNA da diversi tipi di tessuti. Sostanze potenzialmente interferenti possono provenire da diverse fonti, ad es. metaboliti naturali specifici per il tipo di tessuto e l'organo, metaboliti prodotti durante condizioni patologiche, sostanze introdotte durante il trattamento del paziente o sostanze ingerite dal paziente. A causa della complessità delle sostanze potenzialmente interferenti e della diversa sensibilità delle specifiche applicazioni a valle, raccomandiamo agli utenti di valutare l'effetto delle sostanze interferenti per i propri sistemi e di validare il metodo di controllo dell'interferenza nella propria specifica applicazione diagnostica a valle.

Per maggiori informazioni riguardo le sostanze interferenti in specifiche applicazioni QIAGEN a valle, fare riferimento ai manuali dei kit.

Contaminazione crociata

Per valutare il livello di contaminazione crociata, sono stati utilizzati due campioni NSCLC di linea cellulare FFPE: il ceppo selvatico e il campione di linea cellulare FFPE, che presentava la mutazione L858R dell'esone 21. Lo studio aveva lo scopo di simulare la situazione in cui campioni contenenti un elevato livello di mutazioni possono provocare la contaminazione crociata di altri campioni nel corso della procedura di estrazione. È stata effettuata la purificazione del DNA per testare la procedura purificando il DNA di campioni L858R mutanti collocati accanto a campioni del ceppo selvatico, utilizzando un unico lotto di reagenti. La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando il kit *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR. I risultati non hanno mostrato alcuna contaminazione crociata nell'intero sistema.

Prestazioni dell'eluato di QIAamp DSP DNA FFPE DNA in Pyrosequencing[®]

Il DNA isolato da tessuto FFPE è stato diluito fino a una concentrazione di DNA di 2 ng/μl per essere testato con l'analisi *therascreen* EGFR Pyro. In tutte le ripetizioni utilizzate per la determinazione delle caratteristiche prestazionali, il segnale era superiore a 30 RLU (unità di luce relative) per tutti i codoni e tutti i campioni hanno dato un risultato medico corretto per l'analisi delle mutazioni.

Stabilità dell'eluato

La stabilità dell'eluato dipende dal contenuto di impurità purificate congiuntamente e dal loro tipo (in relazione al tipo di tessuto), dal volume di eluizione e dalle condizioni di conservazione. Si raccomanda agli utenti di verificare la stabilità dell'eluato secondo i propri requisiti particolari.

Se il kit viene utilizzato unitamente a un'applicazione QIAGEN a valle, fare riferimento al relativo manuale per le istruzioni.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici del prodotto, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN®. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QuantiTect®, Pyrosequencing®, Rotor-Gene®, theascreen® (QIAGEN Group); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc).

© 2017, QIAGEN, tutti i diritti riservati. 02/2017 HB-0414-D01

Ordini www.qiagen.com/contact | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com