

# Petunjuk Penggunaan QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue Kit (Karakteristik Kinerja)

Versi 2



Untuk Penggunaan Diagnostik In Vitro

Untuk digunakan dengan QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Jerman

R1

Karakteristik Kinerja tersedia secara elektronik dan dapat ditemukan pada tab sumber daya dari halaman produk di [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Pengenalan Umum

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit adalah sistem yang menggunakan teknologi membran silika (teknologi QIAamp) untuk mengisolasi dan memurnikan DNA genomik dari spesimen biologis terfiksasi formalin dan tertanam dalam parafin (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Kit ini digunakan untuk tujuan penyiapan sampel manual dan tidak memberikan hasil pengujian, kualitatif maupun kuantitatif.

# Karakteristik Kinerja

Catatan: Karakteristik Kinerja sangat bergantung pada berbagai faktor dan berkaitan dengan aplikasi hilir tertentu. Ini telah ditetapkan untuk QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit sehubungan dengan tipe jaringan tertanam FFPE contoh dan aplikasi hilir contoh. Akan tetapi, metode untuk mengisolasi asam nukleat digunakan sehubungan dengan spesimen biologis yang berbeda dan sebagai awal untuk beberapa aplikasi hilir. Parameter kinerja seperti kontaminasi silang atau pengulangan dan reproduksibilitas proses perlu ditetapkan untuk alur kerja mana pun tersebut sebagai bagian dari pengembangan aplikasi hilir. Oleh karena itu, merupakan tanggung jawab pengguna untuk memvalidasi keseluruhan alur kerja untuk menetapkan parameter kinerja yang sesuai.

## Kinerja dasar dan kompatibilitas dengan aplikasi hilir lain

### Analisis hilir

DNA genomik yang diekstraksi siap digunakan dalam berbagai uji kadar hilir, termasuk berbagai uji kadar hilir diagnostik in vitro. Lihat buku pegangan kit QIAGEN® terkait untuk informasi selengkapnya tentang kinerja sistem spesifik.

### Hasil DNA yang dimurnikan

Sampel terfiksasi formalin dan tertanam dalam parafin (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) dapat menunjukkan derajat heterogenitas jaringan yang tinggi. Selain itu, luas permukaan jaringan sangat beragam dalam sampel FFPE, sehingga menyebabkan beragamnya kuantitas dan kualitas DNA yang diekstraksi. Dengan demikian, pengguna harus mengoptimalkan jumlah tampang, ketebalan tampang, dan luas permukaan tampang untuk sampel kepentingannya dan setiap prosedur yang digunakan dalam laboratoriumnya untuk mendapatkan DNA dalam kuantitas dan kualitas yang sesuai untuk aplikasi hilir spesifik.

Jika kit digunakan sehubungan dengan aplikasi hilir QIAGEN, lihat buku pegangan terkait untuk petunjuk.

Dehidrasi jaringan yang tidak memadai selama penyiapan jaringan FFPE, memasukkan terlalu banyak parafin dengan sampel ke tabung ekstraksi, menggunakan etanol dengan kemurnian rendah (bukan grade biologi molekuler) dari yang direkomendasikan atau adanya xilena atau etanol dalam sampel dapat mengakibatkan ekstraksi suboptimal dan rendahnya kuantitas dan kualitas DNA.

### Pengulangan

Pengulangan dievaluasi menggunakan 6 lini sel FFPE yang dihasilkan dari sel manusia yang terfiksasi dalam formalin dan tertanam dalam parafin. Sampel diuji dengan campuran master QuantiTect® SYBR® Green dan primer spesifik gen  $\beta$ -aktin bersama dengan cycler real-time PCR Rotor-Gene® Q. Reaksi PCR dilakukan untuk fragmen 174 bp dan untuk fragmen 218 bp dari gen  $\beta$ -aktin.

Untuk analisis statistik, digunakan 72 poin data untuk ukuran fragmen masing-masing. Analisis statistik menyertakan penghitungan simpangan baku (Standard Deviation, SD) dan batas atas dan bawah kepercayaan 95%. Variasi diperkirakan menggunakan analisis komponen ragam sebagai simpangan baku untuk fragmen 218 bp (SD: 0,342 CT; batas bawah kepercayaan 95%: 0,291; batas atas kepercayaan 95%: 0,413). Ini dapat digunakan sebagai perkiraan pengulangan untuk proses ekstraksi. Variasi yang diperkirakan untuk fragmen 174 bp adalah 0,258 CT; batas bawah kepercayaan 95%: 0,220; batas atas kepercayaan 95%: 0,312.

## Reproduksibilitas

Penilaian reproduksibilitas dilakukan di tiga laboratorium menggunakan 3 spesimen FFPE klinis yang mengandung jaringan kanker paru bukan-sel kecil (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): satu menyembunyikan penghapusan mutasi 6223, satu menyembunyikan mutasi L858R, dan satu menyembunyikan spesimen tipe liar (Wild-Type, WT). Spesimen FFPE klinis dipilih berdasarkan status mutasinya yang dikenali sesuai dengan pembentukan sekuens Sanger.

Untuk setiap spesimen FFPE klinis mutan, 48 tampang FFPE sekuensial diacak berpasangan untuk digunakan dalam ekstraksi dan dibagi ke dalam tiga batch, satu batch per lokasi pengujian.

Ekstraksi dilakukan dalam duplikat di setiap lokasi pengujian. Setiap lokasi menggunakan satu lot unik QIAamp FFPE DNA DSP Kit untuk ekstraksi. Penilaian sampel dan penilaian mutasi dilakukan menggunakan *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit di ketiga lokasi. Sampel diuji dalam 3 hari tidak berturut-turut selama 6 hari. Setiap spesimen diuji 6 kali di setiap lokasi, sehingga totalnya terdapat 18 poin data per spesimen.

Untuk semua sampel, di ketiga lokasi, ditunjukkan adanya 100% panggilan mutasi yang benar.

## Linearitas

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit dapat digunakan untuk isolasi DNA dari berbagai tipe jaringan. Rentang linear harus ditetapkan sesuai dengan kebutuhan pelanggan dan divalidasi untuk penggunaan tertentu. Diperkirakan adanya rentang linear yang berbeda untuk tipe jaringan yang berbeda, tergantung pada muatan jaringan ke dalam sistem, serta karakteristik jaringan.

## Zat yang mengganggu

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit dapat digunakan untuk isolasi DNA dari berbagai tipe jaringan. Potensi zat yang mengganggu dapat berasal dari berbagai sumber, misalnya, metabolit alami spesifik untuk tipe jaringan dan organ, metabolit yang diproduksi selama kondisi patologis, zat yang dimasukkan selama perawatan pasien, atau zat yang ditelan oleh pasien.

Pengujian zat yang mengganggu telah dilakukan menggunakan QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit untuk persiapan sampel sehubungan dengan aplikasi hilir contoh untuk penilaian kualitas asam nukleat yang diekstrak. Contoh untuk kit QIAGEN diagnostik yang diuji tercantum dalam Tabel 1.

Akan tetapi, aplikasi hilir yang berbeda mungkin memiliki kebutuhan yang berbeda sehubungan dengan kemurnian (yakni, tidak adanya potensi zat yang mengganggu) dan pengganggu yang terdapat dalam sampel tertentu mungkin beragam. Sehingga, identifikasi, pengujian, dan kendali zat yang mengganggu terkait juga perlu ditetapkan sebagai bagian dari alur kerja diagnostik spesifik yang melibatkan QIAamp DSP FFPE Tissue Kit dan aplikasi hilir spesifik.

Tabel 1. Studi Zat yang Mengganggu Uji Kadar Hilir

Kit Diagnostik	Pengganggu yang Diuji	Kesimpulan
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Lilin Parafin Xilena Etanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobin	Lima sampel mutan (masing-masing mewakili salah satu uji kadar dalam Kit PIK3CA) dan satu sampel WT dibubuhi dengan 9 potensi zat yang mengganggu dan diuji pengaruhnya pada rata-rata $\Delta C_t$ dan panggilan mutasi.  Data dari studi ini menunjukkan bahwa pengganggu yang diuji tidak memiliki pengaruh terhadap sampel WT atau mutan pada konsentrasi yang digunakan. Jika diamati adanya perbedaan yang signifikan, artinya ini berada dalam presisi menengah 3x pada uji kadar, sehingga berada dalam variabilitas melekat pada uji kadar.  Semua panggilan mutasi dalam sampel WT dan mutan berada dalam perkiraan. Data yang diamati dalam studi ini menunjukkan bahwa studi tersebut memenuhi kriteria penerimaan.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Lilin Parafin Xilena Etanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Studi ini dirancang untuk mengevaluasi pengaruh potensi zat yang mengganggu terhadap kinerja kit KRAS.  Untuk sampel mutan, tujuannya adalah untuk menunjukkan bahwa rata-rata nilai uji kadar dalam sampel dengan zat yang mengganggu tidak berbeda secara signifikan dari rata-rata nilai uji kadar dalam sampel tanpa zat yang mengganggu. Untuk sampel WT, tujuannya adalah untuk menunjukkan bahwa keberadaan zat yang mengganggu tidak akan menyebabkan hasil positif palsu.  Terdapat dua kombinasi zat yang mengganggu/uji kadar yang menyebabkan hasil positif palsu. Akan tetapi, keduanya berada dalam level xilena yang rendah tanpa perbandingan positif palsu dalam sampel dengan level tinggi.  Kedua tujuan ini tercapai, sehingga mengonfirmasi hipotesis bahwa tidak ada zat dari QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit pada konsentrasi dalam penggunaan normal yang mengganggu kemampuan kit KRAS untuk membedakan antara sampel positif mutasi dan negatif mutasi.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Lilin Parafin Xilena Etanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AW1 Buffer AW2	Tujuan studi ini adalah untuk memastikan pengaruh potensi zat yang mengganggu yang digunakan dalam proses ekstraksi terhadap kinerja <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) saat digunakan pada QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Platform (RGQ).  Delapan sampel standar FFPE yang mewakili masing-masing dari 7 uji kadar EGFR ditambah satu tipe liar (Wild-Type, WT) dipilih untuk studi ini.  Perkiraan selisih dalam rata-rata nilai $\Delta C_t$ untuk masing-masing Standar FFPE mutan antara masing-masing dari kedua level pengganggu, dan replikat "Blank" (Kosong) tidak berbeda secara signifikan dari nol atau dianggap kecil dengan nilai kurang dari 1Ct.  Semua replikat mutan memiliki panggilan mutasi dari mutasi yang terdeteksi pada masing-masing dari level pengganggu rendah dan tinggi untuk semua pengganggu. Semua replikat WT memiliki status mutasi sampel dari mutasi yang tidak terdeteksi pada masing-masing dari level pengganggu rendah dan tinggi untuk semua pengganggu.  Studi ini mengonfirmasi bahwa reagen yang digunakan dalam Kit Ekstraksi FFPE tidak memengaruhi kinerja Kit EGFR.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Lilin Parafin Xilena Etanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Ini dirancang untuk menunjukkan bahwa keberadaan potensi zat yang mengganggu (dari QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Kit Ekstraksi FFPE)) tidak memproduksi hasil positif palsu atau negatif palsu apa pun untuk kit NSCLC Sistem KRAS; yakni, panggilan mutasi akan terpengaruh atau menyebabkan sistem "fail-safe" dengan memproduksi status sampel yang tidak valid.  Diidentifikasi adanya delapan potensi zat yang mengganggu dari proses ekstraksi DNA. Masing-masing zat diuji pada 8 lini sel FFPE, yang mewakili masing-masing dari 7 mutasi yang dideteksi oleh Kit NSCLC Kit KRAS, dan sampel WT. Sampel mutasi diuji pada level yang berkaitan dengan kisaran 3 kali batas deteksi (3 x LOD).  Studi menunjukkan bahwa zat yang diuji tidak memiliki pengaruh buruk terhadap kinerja uji kadar pada 1x level pengganggu; panggilan mutasi yang benar selalu terpanggil dan keberadaan zat yang mengganggu tidak memiliki pengaruh yang signifikan secara statistik terhadap selisih dalam $\Delta C_t$ pada sebagian besar kondisi sampel yang diuji (58 dari 64 kondisi, pada level 1x). Untuk 6 sampel yang menunjukkan selisih yang signifikan secara statistik, selisih yang diamati dalam rata-rata untuk masing-masing sampel berada dalam kriteria penerimaan studi sebesar $\pm 2 \times SD$ (perkiraan SD yang diambil dari laporan studi pengulangan dan reproduksibilitas).  Studi ini juga menunjukkan bahwa uji kadar toleran terhadap level lebih tinggi pada masing-masing zat daripada limbah yang diperkirakan, yakni, panggilan mutasi yang benar diberikan saat zat yang mengganggu ada pada 10x konsentrasi tertinggi yang diperkirakan.

Lihat buku pegangan kit untuk informasi selengkapnya tentang zat yang mengganggu dalam aplikasi hilir QIAGEN spesifik.

## Kontaminasi silang

Untuk menilai tingkat kontaminasi silang, digunakan dua sampel NSCLC lini sel FFPE: Sampel lini sel FFPE dan WT yang menyembunyikan mutasi L858R ekson 21. Studi ini bertujuan untuk meniru situasi di mana sampel yang mengandung level tinggi mutasi asam nukleat dapat mengontaminasi silang sampel lain dalam prosedur ekstraksi. Pemurnian DNA dilakukan untuk menantang prosedur dengan memurnikan DNA dari sampel mutan L858R yang diletakkan di samping sampel WT, menggunakan satu lot reagen. Kontaminasi silang dinilai menggunakan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Hasil menunjukkan tidak ada kontaminasi silang dalam seluruh sistem.

## Kinerja eluat QIAamp DSP DNA FFPE DNA dalam uji kadar Pyrosequencing® dan berbasis qPCR

DNA yang diisolasi dari jaringan FFPE diencerkan ke konsentrasi DNA sebesar 2 ng/µl untuk analisis menggunakan *therascreen* EGFR Pyro Assay. Dalam semua proses yang digunakan untuk penentuan karakteristik kinerja, sinyalnya lebih dari 30 unit cahaya relatif (Relative Light Units, RLU) untuk semua kodon dan semua sampel memiliki hasil medis yang benar untuk analisis mutasi.

DNA yang diisolasi dari jaringan FFPE pasien dengan kanker kolorektum, kanker paru bukan-sel kecil, dan kanker payudara digunakan secara langsung dalam *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit, dan *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Nilai Ct DNA yang diekstrak menggunakan QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit berada dalam parameter rentang kerja yang ditentukan untuk uji kadar masing-masing dan dirinci dalam buku pegangan terkait.

## Stabilitas eluat

Stabilitas eluat akan bergantung pada kandungan dan tipe kotoran yang dimurnikan bersama (terkait tipe jaringan), volume elusi, dan kondisi penyimpanan. Kami merekomendasikan agar pengguna menetapkan stabilitas eluat sesuai dengan kebutuhan untuk persyaratan tertentu.

Jika kit digunakan sehubungan dengan aplikasi hilir QIAGEN, lihat buku pegangan kit terkait untuk petunjuk. Studi verifikasi stabilitas contoh telah menunjukkan bahwa DNA yang diekstrak dari sampel jaringan FFPE cocok untuk digunakan dengan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit jika disimpan selama maksimum 7 hari pada suhu 4 °C dengan penyimpanan tambahan pada suhu -20 °C selama maksimum total kombinasi lima minggu dengan beberapa siklus beku/cair.

## Simbol

Simbol berikut muncul dalam dokumen ini. Untuk daftar lengkap simbol-simbol yang digunakan dalam petunjuk penggunaan atau pada kemasan dan label, silakan lihat buku pegangan.

Simbol	Definisi simbol
	Produk ini memenuhi persyaratan Peraturan Eropa 2017/746 untuk perangkat medis diagnostik in vitro.
	Perangkat medis diagnostik in vitro
	Nomor katalog
Rn	R adalah untuk revisi Instruksi Penggunaan dan n adalah nomor revisi
	Produsen

## Riwayat Revisi

Revisi	Deskripsi
R1, Juni 2022	Versi 2, Revisi 1 <ul style="list-style-type: none"><li>• Pembaruan pada versi 2 untuk kesesuaian terhadap IVDR</li><li>• Bab untuk Zat yang mengganggu, Kontaminasi silang, Stabilitas eluat, dan Kompatibilitas terhadap aplikasi hilir ditambahkan</li></ul>

Untuk informasi pelisensian terbaru dan penafian produk-spesifik, lihat buku pegangan atau panduan pengguna kit QIAGEN. Buku pegangan atau panduan pengguna kit QIAGEN tersedia di [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) atau dapat dipesan dari Layanan Teknis QIAGEN atau distributor lokal Anda.

Merek Dagang: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, #therascreen® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Nama, merek dagang terdaftar, dll. yang digunakan di dalam dokumen ini, meski tidak secara khusus ditandai sebagaimana demikian, tidak akan dianggap tidak dilindungi oleh undang-undang.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, hak cipta dilindungi undang-undang.

