



Junio de 2022

Instrucciones de uso (características del rendimiento) de QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

Versión 2



Para uso diagnóstico in vitro
Para uso con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemania

R1

Encontrará las características del rendimiento en formato electrónico en la pestaña resources (recursos) de la página de productos en www.qiagen.com.

Introducción general

El kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue es un sistema que utiliza la tecnología de membrana de gel de sílice (tecnología QIAamp) para el aislamiento y la purificación de ADN genómico procedente de muestras biológicas fijadas en formalina e incorporadas en parafina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Está destinado a la preparación de muestras y no proporciona resultados cualitativos o cuantitativos de las pruebas.

Características del rendimiento

Nota: Las características del rendimiento dependen en gran medida de varios factores y están relacionadas con la aplicación anterógrada específica. Se han establecido para el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit junto con tipos de tejido fijado en FFPE ejemplares y aplicaciones anterógradas ejemplares. Sin embargo, los métodos para aislar los ácidos nucleicos se usan junto con diferentes muestras biológicas y como método inicial para varias aplicaciones anterógradas. Deben establecerse los parámetros de rendimiento, como la contaminación cruzada o la repetibilidad y reproducibilidad de la serie de cualquier flujo de trabajo como parte del desarrollo de la aplicación anterógrada. Por lo tanto, es responsabilidad del usuario validar el flujo de trabajo completo para establecer los parámetros de rendimiento adecuados.

Rendimiento básico y compatibilidad con diferentes aplicaciones anterógradas

Análisis anterógrados

El ADN genómico eluido está listo para su uso en distintos ensayos anterógrados, incluidos varios tipos de ensayos anterógrados de diagnóstico in vitro. Consulte el manual de uso del QIAGEN® kit correspondiente para obtener más información sobre el rendimiento de un sistema determinado.

Rendimiento del ADN purificado

Las muestras fijadas en formalina e incorporadas en parafina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) pueden mostrar un alto grado de heterogeneidad tisular. Además, el área superficial del tejido puede variar en gran medida en las muestras FFPE, lo que puede originar una cantidad y una calidad variables del ADN extraído. Por consiguiente, el usuario deberá optimizar el número de cortes, su grosor y área superficial en sus muestras de interés y en los procedimientos empleados en su laboratorio para obtener ADN de cantidad y calidad adecuadas para las aplicaciones anterógradas específicas.

Si se utiliza el kit junto con una aplicación QIAGEN anterógrada, consulte el correspondiente manual de uso para obtener instrucciones.

Una deshidratación tisular insuficiente durante la preparación de tejido FFPE, la adición de un exceso de parafina con la muestra en el tubo de extracción, el uso de etanol de menor pureza (en lugar de etanol de calidad apta para biología molecular) que la recomendada o la conservación del xileno o el etanol en la muestra pueden llevar a que la extracción no sea óptima y la cantidad y calidad del ADN sean bajas.

Repetibilidad

La repetibilidad se evaluó utilizando 6 líneas celulares FFPE generadas a partir de células humanas fijadas en formalina e incorporadas en parafina. Las muestras se analizaron con mezcla maestra QuantiTect® SYBR® Green y cebadores de β -actina específicos del gen junto con el termociclador de real-time PCR Rotor-Gene® Q. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un fragmento de 174 bp y un fragmento de 218 bp del gen β -actina humano.

Para los análisis estadísticos, se utilizaron 72 puntos de datos con cada tamaño de fragmento. Los análisis estadísticos incluyeron el cálculo de la desviación estándar (DE) y los límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95 %. La variación se calculó utilizando el análisis de componentes de varianza como la desviación estándar para el fragmento de 218 bp (DE: 0,342 CT; límite inferior del intervalo de confianza del 95 %: 0,291; límite superior del intervalo de confianza del 95 %: 0,413). Esto puede emplearse como cálculo de repetibilidad para el proceso de extracción. La variación calculada para el fragmento de 174 bp fue de 0,258 CT; límite inferior del intervalo de confianza del 95 %: 0,220; límite superior del intervalo de confianza del 95 %: 0,312.

Reproducibilidad

La evaluación de reproducibilidad se llevó a cabo en tres laboratorios, utilizando 3 muestras FFPE clínicas que contenían tejido de cáncer de pulmón no microcítico (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): una muestra con una mutación por delección 6223, una con mutación L858R y una de tipo natural (Wild-Type, WT). Las muestras FFPE clínicas se seleccionaron basándose en el estado de mutación conocido según la secuenciación de Sanger.

Para cada una de las muestras FFPE clínicas mutantes, se asignaron aleatoriamente 48 secciones FFPE secuenciales en parejas para su uso en una extracción y se dividieron en tres lotes, uno por cada centro de ensayo.

Las extracciones se llevaron a cabo por duplicado en cada centro de ensayo. Cada centro utilizó un lote exclusivo de los QIAamp FFPE DNA DSP Kits para la extracción. Se llevó a cabo la evaluación de muestras y de mutaciones utilizando el *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit en los tres centros. Las muestras se analizaron en 3 días no consecutivos durante un período de 6 días. Cada muestra fue analizada 6 veces en cada centro, lo que dio lugar a un total de 18 puntos de datos para cada muestra.

Para todas las muestras, en los tres centros, se observó un 100 % de identificaciones de mutaciones correctas.

Linealidad

El kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue se puede utilizar para el aislamiento de ADN procedente de diferentes tipos de tejido. Debe establecerse un intervalo lineal según los requisitos del cliente y validarse para cada uso particular. Se prevén diferentes rangos lineales en los diferentes tipos de tejidos, en función de la carga tisular en el sistema, así como de las características del tejido.

Sustancias interferentes

El kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue se puede utilizar para el aislamiento de ADN procedente de diferentes tipos de tejido. Las sustancias potencialmente interferentes pueden proceder de diferentes orígenes, por ejemplo, metabolitos naturales específicos del tipo de tejido y órgano, metabolitos producidos durante estados patológicos, sustancias introducidas durante tratamientos del paciente o sustancias ingeridas por el paciente.

El análisis de sustancias interferentes se ha realizado con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit para la preparación de las muestras junto con aplicaciones anterógradas ejemplares para evaluar la calidad de los ácidos nucleicos extraídos. En la Tabla 1 se incluyen ejemplos de los kits QIAGEN de prueba de diagnóstico.

Sin embargo, distintas aplicaciones anterógradas pueden tener diferentes requisitos en cuanto a la pureza (p. ej., ausencia de posibles sustancias interferentes) y los interferentes presentes en la muestra específica pueden ser diversos. Por lo tanto, también es necesario establecer la identificación, el análisis y el control de las sustancias interferentes correspondientes como parte del flujo de trabajo de diagnóstico específico que incluyen el QIAamp DSP FFPE Tissue Kit y la aplicación anterógrada específica.

Tabla 1. Estudio de sustancias interferentes de ensayo anterógrado

Kit de diagnóstico	Interferentes analizados	Conclusión
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Cera de parafina Xileno Etanol Buffer ATL Proteinasa K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobina	A cinco muestras mutantes (cada una representaba uno de los ensayos del PIK3CA Kit) y a una muestra de tipo natural se les añadieron 9 posibles sustancias interferentes y se analizó su efecto en la media de ΔCt y la identificación de mutaciones. Los datos de este estudio indican que los interferentes analizados no tenían efecto sobre las muestras mutantes o de tipo natural en las concentraciones utilizadas. Si se observaba una diferencia significativa, dicha diferencia se encontraba en 3 veces la precisión intermedia aceptable del ensayo y estaba, por lo tanto, dentro de la variabilidad inherente del ensayo. Todas las identificaciones de mutación tanto en muestras mutantes como de tipo natural fueron las esperadas. Los datos observados en este estudio indican que el estudio cumplía con los criterios de aceptación.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Cera de parafina Xileno Etanol Buffer ATL Proteinasa K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Este estudio se diseñó para evaluar los efectos de las posibles sustancias interferentes en el rendimiento del kit KRAS. Para las muestras mutantes, el objetivo era demostrar que los valores medios del ensayo en las muestras con una sustancia interferente no diferían significativamente de aquellas sin la sustancia interferente. Para las muestras de tipo natural, el objetivo era demostrar que la presencia de una sustancia interferente no debía producir resultados falsos positivos. Había dos combinaciones de ensayo/sustancia interferente que produjeron resultados falsos positivos. Sin embargo, estos correspondían al bajo nivel del xileno sin falsos positivos comparables en las muestras de alto nivel. Se cumplieron ambos objetivos, confirmando la hipótesis de que ninguna sustancia del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit en las concentraciones del uso normal interfiere con la capacidad del kit KRAS para distinguir entre muestras positivas y negativas a la mutación.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Cera de parafina Xileno Etanol Buffer ATL Proteinasa K Buffer AW1 Buffer AW2	El objetivo de este estudio era verificar el efecto de las posibles sustancias interferentes en el proceso de extracción en el rendimiento del <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) al utilizarlo en la plataforma Rotor-Gene Q MDx platform (RGQ) de QIAGEN. Para este estudio se eligieron 8 muestras FFPE estándar que representaban cada uno de los 7 ensayos de mutación del EGFR más una de tipo natural. Las diferencias estimadas en los valores medios de ΔCt de cada uno de los estándares FFPE mutantes entre cada uno de los dos niveles de interferentes y las réplicas en "blanco" no fueron significativamente diferentes de cero o se consideraron pequeñas con un valor de menos de 1Ct. Todas las réplicas mutantes tuvieron una identificación de mutaciones de mutación detectada en cada uno de los niveles de bajo y alto interferente para todos los interferentes. Todas las réplicas de tipo natural tuvieron un estado de mutación de mutación no detectada en cada uno de los niveles de bajo y alto interferente para todos los interferentes. El estudio confirmó que los reactivos utilizados en el FFPE Extraction Kit no afectan el rendimiento del EGFR Kit.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Cera de parafina Xileno Etanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	El objetivo del estudio era demostrar que la presencia de una posible sustancia interferente (del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit [FFPE Extraction Kit]) no produciría ningún resultado falso positivo o falso negativo para el KRAS System NSCLC Kit, es decir, la identificación de mutación se vería afectada ni haría que sistema entre en modo "a prueba de fallos" al producir un estado de muestra no válido. Se identificaron ocho posibles sustancias interferentes del proceso de extracción de ADN. Se analizó cada sustancia con 8 líneas celulares FFPE, que representaban cada una de las 7 mutaciones detectadas con el KRAS Kit, el NSCLC Kit y una muestra de tipo natural. Las muestras de mutación se analizaron en un nivel equivalente a 3 veces el límite de detección ($3 \times LOD$). El estudio demostró que las sustancias analizadas no tenían efectos adversos en el rendimiento del ensayo en el nivel 1x del interferente, siempre se realizó la correcta identificación de mutaciones y la presencia de la sustancia interferente no tuvo un efecto estadísticamente significativo en la diferencia en ΔCt en la mayoría de las condiciones de la muestra analizada (58 de 64 condiciones en una vez el nivel). Para las 6 muestras que no mostraron una diferencia estadísticamente significativa, la diferencia observada en las medias de cada muestra se encontraba dentro del criterio de aceptación del estudio de $\pm 2 \times DE$ (estimación de DE obtenida del informe del estudio de repetibilidad y reproducibilidad). El estudio también demostró que el ensayo toleraba niveles de cada una de las sustancias más altos que el arrastre previsto, es decir, se realizaba la identificación correcta de las mutaciones si la sustancia interferente estaba presente diez veces la concentración máxima prevista.

Consulte los manuales de uso del kit para obtener más información sobre las sustancias interferentes en aplicaciones anterógradas de QIAGEN específicas.

Contaminación cruzada

Para evaluar el nivel de contaminación cruzada, se utilizaron dos muestras NSCLC de la línea celular FFPE: la de tipo natural y la muestra de la línea celular FFPE con la mutación L858R del exón 21. El estudio tenía como fin simular las condiciones en las que muestras con un elevado nivel de mutación pueden realizar una contaminación cruzada de otras muestras dentro del procedimiento de extracción. Se llevó a cabo una purificación del ADN para cuestionar el procedimiento purificando ADN de las muestras mutantes L858R situadas junto a muestras de tipo natural, utilizando un lote de reactivos. La contaminación cruzada se evaluó con el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Los resultados mostraron ausencia de contaminación cruzada en todo el sistema.

Rendimiento del eluido de QIAamp DSP DNA FFPE DNA en Pyrosequencing® y ensayos basados en qPCR

El ADN aislado del tejido FFPE se diluyó hasta una concentración de ADN de 2 ng/μl para su análisis utilizando el ensayo *therascreen* EGFR Pyro. En todos los análisis empleados para la determinación de las características de rendimiento, la señal fue de más de 30 RLU (unidades de luz relativas) para todos los codones y todas las muestras presentaron un resultado médico correcto en el análisis de mutación.

El ADN aislado de tejido FFPE de pacientes con cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de mama se usó directamente en el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, el *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, el KRAS RGQ PCR NSCLC Kit y el *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Los valores Ct del ADN extraído con el QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit se encontraban en los parámetros de rango de trabajo definidos para cada ensayo y detallados en los respectivos manuales de uso.

Estabilidad del eluido

La estabilidad del eluido dependerá del contenido y del tipo de impurezas copurificadas (relacionadas con el tipo de tejido), del volumen de elución y de las condiciones de almacenamiento. Recomendamos que los usuarios determinen la estabilidad del eluido según sus requisitos particulares.

Si se utiliza el kit junto con una aplicación QIAGEN anterógrada, consulte el correspondiente manual de uso del kit para obtener instrucciones. Un estudio de verificación de estabilidad ejemplar ha demostrado que el ADN extraído de muestras de tejido FFPE puede utilizarse adecuadamente con el *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit si se conserva durante 7 días a 4 °C con una conservación adicional a -20 °C durante un total combinado de cinco semanas con varios ciclos de congelación y descongelación.

Símbolos

En este documento aparecen los siguientes símbolos. Consulte el manual de uso para obtener una lista completa de los símbolos utilizados en las instrucciones de uso o en el embalaje y en el etiquetado.

Símbolo	Definición del símbolo
	Este producto cumple los requisitos del reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro.
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
Rn	"R" es la revisión de las Instrucciones de uso y "n" es el número de revisión
	Fabricante

Historial de revisiones

Revisión	Descripción
R1, junio de 2022	<p>Versión 2, revisión 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Actualización a la versión 2 para el cumplimiento con IVDR• Se han añadido las secciones de Sustancias interferentes, Contaminación cruzada, Estabilidad del eluido y Compatibilidad con las aplicaciones anterógradas

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales de uso y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc., utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

