

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

Bruksanvisning (ytelsesegenskaper)

Versjon 2

IVD

Til in vitro-diagnostisk bruk

Til bruk sammen med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

CE

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1

Ytelsesegenskaper er tilgjengelige elektronisk under fanen Resources (Ressurser) på produktsiden til www.qiagen.com.

Generell innledning

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit er et system som bruker en silikamembranteknologi (QIAamp-teknologi) til isolasjon og rensing av genomisk DNA fra formalinfikserte, parafininnstøpte (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) biologiske prøver.

Det er beregnet på manuell prøveklargjøring og gir ingen testresultater, hverken kvalitative eller kvantitative.

Ytelseegenskaper

Merk: Ytelseegenskaper avhenger i stor grad av ulike faktorer og er relatert til den spesifikke nedstrømsapplikasjonen. De er etablert for QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit sammen med eksempler på FFPE-innstøpte vevstyper og eksempler på nedstrømsapplikasjoner. Metoder for å isolere nukleinsyrer brukes imidlertid sammen med ulike biologiske prøver og som "front-end" for flere nedstrømsapplikasjoner. Ytelsesparametere som krysskontaminering eller repeterbarhet og reproducerbarhet for kjøring må etableres for enhver slik arbeidsflyt som en del av utviklingen av nedstrømsapplikasjoner. Derfor er det brukerens ansvar å validere hele arbeidsflyten for å etablere egnede ytelsesparametere.

Grunnleggende ytelse og kompatibilitet for forskjellige nedstrømsapplikasjoner

Nedstrømsanalyse

Elvert genomisk DNA er klart til bruk i ulike nedstrømsanalyser, inkludert en rekke ulike in vitro-diagnostiske nedstrømsanalyser. Se den relevante håndboken for QIAGEN®-settet for mer informasjon om spesifikk systemytelse.

Utbytte av rensed DNA

Formalinfikserte, parafininnstøpte (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) prøver kan vise en høy grad av vevsheterogenitet. I tillegg er vevsoverflatearealet svært variabelt i FFPE-prøver, noe som fører til varierende mengde og kvalitet på ekstrahert DNA. Derfor bør brukeren optimalisere antall snitt, snittykkelse og snittoverflateareal for prøven av interesse og eventuelle prosedyrer som brukes i laboratoriet for å oppnå DNA av egnet mengde og kvalitet for de spesifikke nedstrømsapplikasjonene.

Hvis settet brukes sammen med en QIAGEN-nedstrømsapplikasjon, bør du se i den relevante håndboken for instruksjoner.

Utilstrekkelig vevsuttørring under FFPE-vevsklargjøring, plassering av for mye parafin med prøven til ekstraksjonsrøret, bruk av etanol med lavere renhet (ikke av molekylærbiologisk kvalitet) enn anbefalt, eller retensjon av xylen eller etanol i prøven kan føre til suboptimal ekstraksjon og lav DNA-mengde og -kvalitet.

Repeterbarhet

Repeterbarheten ble evaluert ved å bruke 6 FFPE-cellelinjer generert fra humane celler fiksert i formalin og innstøpt i parafin. Prøvene ble testet med QuantiTect® SYBR® Green masterblanding og primere spesifikke for β -aktingenet sammen med Rotor-Gene® Q real-time PCR-termosyklere. PCR-reaksjoner ble utført for et 174 bp-fragment og for et 218 bp-fragment av det humane β -aktingenet.

For den statistiske analysen ble det brukt 72 datapunkter for hver fragmentstørrelse. Statistisk analyse inkluderte beregning av standardavvik (Standard Deviation, SD) og øvre og nedre 95 % konfidensgrenser. Variasjonen ble estimert ved å bruke varianskomponentanalyse som standardavviket for 218 bp-fragmentet (SD: 0,342 CT; nedre 95 % konfidensgrense: 0,291; øvre 95 % konfidensgrense: 0,413). Dette kan brukes som et estimat for repeterbarhet for ekstraksjonsprosessen. Variasjon estimert for 174 bp-fragment var 0,258 CT; nedre 95 % konfidensgrense: 0,220; øvre 95 % konfidensgrense: 0,312.

Reproduserbarhet

Vurdering av reproduserbarhet ble utført på tvers av tre laboratorier ved bruk av 3 kliniske FFPE-prøver med vev av typen ikke-småcellet lungekreft (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): ett med en delelesjon 6223-mutasjon, ett med en L858R-mutasjon og ett med prøvetypen villtype (Wild-Type, WT). De kliniske FFPE-prøvene ble valgt på grunnlag av deres kjente mutasjonsstatus i henhold til Sanger-sekvensering.

For hver av de mutante kliniske FFPE-prøvene ble 48 sekvensielle FFPE-snitt randomisert i par for bruk i en ekstraksjon og delt inn i tre partier, et parti per teststed.

Ekstraksjoner ble utført i duplikat på hvert teststed. Hvert sted brukte ett unikt parti av QIAamp FFPE DNA DSP Kit for ekstraksjon. Prøvevurdering og mutasjonsvurdering ble utført ved bruk av *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit på tvers av alle tre stedene. Prøver ble testet på 3 ikke-påfølgende dager over en periode på 6 dager. Hver prøve ble testet 6 ganger på hvert sted, noe som ga totalt 18 datapunkter per prøve.

100 % korrekte mutasjonsbetegnelser ble vist for alle prøvene, på alle de tre stedene.

Linearitet

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan brukes til isolering av DNA fra forskjellige vevstyper. Et lineært område bør etableres i henhold til kundens krav og valideres for den spesielle bruken. Ulike lineære områder forventes for forskjellige vevstyper, avhengig av vevsbelastningen i systemet, samt vevskarakteristikker.

Interfererende stoffer

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan brukes til isolering av DNA fra forskjellige vevstyper. Potensielt interfererende stoffer kan stamme fra forskjellige kilder, for eksempel naturlige metabolitter som er spesifikke for vevstypen og organet, metabolitter produsert under patologiske tilstander, stoffer introdusert under pasientbehandling eller stoffer som pasienten har inntatt.

Testing av interfererende stoffer er utført ved bruk av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit for prøveklargjøring i forbindelse med eksempler på nedstrømsapplikasjoner for en vurdering av kvaliteten på de ekstraherte nukleinsyrene. Eksempler på testede diagnostiske QIAGEN-sett er oppført i tabell 1.

Forskjellige nedstrømsapplikasjoner kan imidlertid ha forskjellige krav med hensyn til renhet (dvs. fravær av potensielle interfererende stoffer), og interferenter som er til stede i den spesifikke prøven, kan være forskjellige. Derfor må identifisering, testing og kontroll av relevante interfererende stoffer også etableres som en del av den spesifikke diagnostiske arbeidsflyten som involverer QIAamp DSP FFPE Tissue Kit og den spesifikke nedstrømsapplikasjonen.

Tabell 1. Studie av interfererende stoffer i nedstrømsanalyse

Diagnossett	Testede interferenser	Konklusjon
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Parafinoks Xylen Etanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobin	Fem mutantprøver (hver representerer en av analysene i PIK3CA-settet) og én WT-prøve ble tilsatt 9 potensielle interfererende stoffer og testet for effekt på gjennomsnittlig ΔC_t og mutasjonsbetegnelse. Dataene fra denne studien viser at interferentene som ble testet, ikke hadde noen effekt på mutant- eller WT-prøver ved konsentrasjonene som ble brukt. Hvis det ble observert en vesentlig forskjell, var dette innen 3x intermedieær presisjon for analysen og derfor innen analysens iboende variabilitet. Alle mutasjonsandeler i både mutant- og WT-prøver var som forventet. Dataene observert i denne studien viser at studien oppfylte akseptkriteriene.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Parafinoks Xylen Etanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Denne studien ble utformet for å evaluere effekten av potensielle interfererende stoffer på ytelsen til KRAS-settet. For mutantprøver var målet å vise at de gjennomsnittlige analyseverdiene i prøver med et interfererende stoff ikke skilte seg signifikant fra de uten det interfererende stoffet. For WT-prøver var målet å demonstrere at tilstedeværelse av et interfererende stoff ikke burde forårsake falskt positive resultater. Det var to kombinasjoner av analyse / interfererende stoff som resulterte i falskt positive resultater. Begge disse var imidlertid ved lavt xylennivå uten sammenlignbare falskt positive i prøvene med høye nivåer. Begge disse målene ble oppfylt, noe som bekrefter hypotesen om at ingen stoffer fra QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ved konsentrasjonene ved normal bruk forstyrrer evnen til KRAS-settet til å skille mellom mutasjonspositive og mutasjonsnegative prøver.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Parafinoks Xylen Etanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AW1 Buffer AW2	Målet med denne studien var å verifisere effekten av potensielle interfererende stoffer brukt i ekstraksjonsprosessen på ytelsen til <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) ved bruk sammen med QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Platform (RGQ). Åtte FFPE-standardprøver som representerer hver av de 7 EGFR-mutasjonsanalysene, pluss én villtype (Wild-Type, WT) ble valgt for denne studien. De estimerte forskjellene i gjennomsnittlige ΔC_t -verdier for hver av mutant-FFPE-standardene mellom hvert av de to nivåene av interferenter, og "Blank"-replikater var enten ikke signifikant forskjellig fra null eller ansett som små med en verdi på mindre enn 1 Ct. Alle mutantreplikater hadde mutasjonsbetegnelsen mutasjon påvist ved hvert av de lave og høye interfererende nivåene for alle interferenter. Alle WT-replikater hadde prøvemutasjonsstatusen mutasjon ikke påvist ved hvert av de lave og høye interfererende nivåene for alle interferenter. Studien bekreftet at reagensene som brukes i FFPE-ekstraksjonssettet, ikke påvirker ytelsen til EGFR-settet.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Parafinoks Xylen Etanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Studien ble utformet for å demonstrere at tilstedeværelsen av et potensielt interfererende stoff (fra QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE Extraction Kit)) ikke ville gi noen falskt positive eller falskt negative resultater for KRAS System NSCLC-settet, dvs. at mutasjonsbetegnelsen ville bli påvirket eller føre til at systemet utløser "feilsikring" ved å produsere en ugyldig prøvestatus. Åtte potensielt interfererende stoffer fra DNA-ekstraksjonsprosessen ble identifisert. Hvert stoff ble testet mot 8 FFPE-cellelinjer, som representerer hver av de 7 mutasjonene som ble påvist av KRAS Kit NSCLC Kit, og én WT-prøve. Mutasjonsprøvene ble testet på et nivå tilsvarende ca. 3 ganger deteksjonsgrensen (3 x LOD). Studien viste at stoffene som ble testet, ikke hadde noen negativ effekt på ytelsen til analysen ved 1x-nivået av interferent. Korrekt mutasjonsbetegnelse ble alltid gjort, og tilstedeværelsen av det interfererende stoffet hadde ikke noen statistisk signifikant effekt på forskjellen i ΔC_t å de fleste prøveforholdene som ble testet (58 av 64 tilstander, på 1x-nivå). For de 6 prøvene som viste en statistisk signifikant forskjell, var den observerte forskjellen i gjennomsnittet for hver prøve innenfor studieakseptkriteriet på $\pm 2 \times SD$ (SD-estimat hentet fra rapporten fra studien av repeterbarhet og reproduserbarhet). Studien viste også at analysen tålte høyere nivåer av hvert av stoffene enn den forventede medrivningen, dvs. riktig mutasjonsbetegnelse ble gjort når det interfererende stoffet var til stede ved 10 ganger den høyeste forventede konsentrasjonen.

Se setthåndbøker for mer informasjon om interfererende stoffer i spesifikke QIAGEN nedstrømsapplikasjoner.

Krysskontaminering

For å vurdere nivået av krysskontaminering ble to FFPE-cellelinje NSCLC-prøver brukt: WT og FFPE-cellelinjeprøven med ekson 21 L858R-mutasjonen. Studien hadde som mål å etterligne situasjonen der prøver som inneholder et høyt nivå av mutasjon, kan krysskontaminere andre prøver innenfor ekstraksjonsprosedyren. DNA-rensing ble utført for å utfordre prosedyren ved å rense DNA fra L858R-mutantprøver plassert ved siden av WT-prøver, med ett reagensparti. Krysskontamineringen ble vurdert ved bruk av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Resultatene viste ingen krysskontaminering i hele systemet.

Eluatytelse for QIAamp DSP DNA FFPE DNA i Pyrosequencing®- og qPCR-baserte analyser

DNA isolert fra FFPE-vev ble fortynnet til en DNA-konsentrasjon på 2 ng/µl for analyse ved bruk av *therascreen* EGFR Pyro Assay. I alle kjøringene som ble brukt for å bestemme ytelsesegenskaper, var signalet over 30 RLU (relative lysenheter) for alle kodoner, og alle prøvene hadde et korrekt medisinsk resultat for mutasjonsanalysen.

DNA isolert fra FFPE-vev fra pasienter med kolorektalkreft, ikke-småcellet lungekreft og brystkreft ble brukt direkte i *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Ct-verdiene til DNA-et ekstrahert ved bruk av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit var innenfor arbeidsområdets parametere definert for hver analyse og beskrevet i de respektive håndbøkene.





Eluatstabilitet

Eluatstabilitet vil avhenge av innholdet og typen samtidig rensede urenheter (relatert til vevstype), elusjonsvolum og oppbevaringsforhold. Vi anbefaler at brukerne etablerer eluatstabiliteten iht. de spesifikke kravene de har.

Hvis settet brukes sammen med en QIAGEN-nedstrømsapplikasjon, se det relevante settets håndbok for instruksjoner. En eksempelstudie for å verifisere stabilitet har vist at DNA ekstrahert fra FFPE-vevsprøver er egnet for bruk med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit når det oppbevares i opptil 7 dager ved 4 °C, med ekstra oppbevaring ved -20 °C i opptil totalt fem uker med flere fryse-tine-sykluser.

Symboler

Følgende symboler vises i dette dokumentet. Du finner en fullstendig liste over symboler brukt i bruksanvisningen eller på emballasjen og merkingen, i håndboken.

Symbol	Symboldefinisjon
	Dette produktet oppfyller kravene i den europeiske bestemmelsen 2017/746 for in vitro-diagnostiske medisinske enheter.
	In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr
	Katalognummer
Rn	R står for revisjon av bruksanvisningen, og n står for revisjonsnummeret
	Produsent

Endringshistorikk

Revisjon

Beskrivelse

R1, juni 2022

Versjon 2, revisjon 1

- Oppdatering til versjon 2 for samsvar med IVDR
- Lagt til avsnitt for interfererende stoffer, krysskontaminering, eluatstabilitet og kompatibilitet med nedstrømsapplikasjoner

Du finner oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser i håndboken eller bruksanvisningen for det aktuelle QIAGEN-settet. Håndbøker og brukerhåndbøker for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan fås på forespørsel fra QIAGENS tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren.

Varemerker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Registrerte navn, varemerker osv. som brukes i dette dokumentet, skal ikke anses som ubeskyttet ved lov, selv når de ikke er spesielt merket som sådan.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN. Med enerett.

