



Červen 2022

# Návod k použití soupravy QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue Kit (charakteristika funkčních vlastností)

Verze 2



Pro diagnostické použití in vitro

Pro použití se soupravou QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Německo

R1

Charakteristika funkčních vlastností je k dispozici elektronicky a lze ji nalézt pod kartou zdrojů na produktové stránce na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Obecný úvod

Souprava QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit je systém, který využívá technologii silikátové membrány (technologie QIAamp) k izolaci a purifikaci genomové DNA z biologických vzorků fixovaných formalínem, zalitých parafínem (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Je určena pro účely ruční přípravy alikvotů a neposkytuje žádné kvalitativní ani kvantitativní výsledky testů.

# Charakteristika funkčních vlastností

**Poznámka:** Charakteristika funkčních vlastností závisí na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Pro soupravu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit byla stanovena ve spojení s příkladnými typy tkání FFPE a příkladnými následnými aplikacemi. Metody izolace nukleových kyselin se však používají ve spojení s různými biologickými vzorky a jako předstupeň pro řadu následných aplikací. Pro každý takový pracovní postup je třeba v rámci vývoje následné aplikace stanovit parametry funkčních vlastností, jako je křížová kontaminace nebo opakovatelnost a reprodukovatelnost cyklu. Proto je povinností uživatele celý pracovní postup validovat a stanovit vhodné parametry funkčních vlastností.

## Základní funkční vlastnosti a kompatibilita s různými následnými aplikacemi

### Následná analýza

Eluovaná genomová DNA je připravena k použití v různých následných analýzách, včetně řady následných analýz pro diagnostické účely in vitro. Další informace o konkrétních funkčních vlastnostech systému naleznete v příručce k příslušné soupravě QIAGEN®.

### Výtěžek purifikované DNA

Alikvoty fixované formalínem, zalité parafínem (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) mohou vykazovat vysoký stupeň heterogenity tkáně. Kromě toho je povrch tkáně v alikvotech FFPE velmi variabilní, což vede k proměnlivému množství i kvalitě extrahované DNA. Uživatel by proto měl optimalizovat počet řezů, tloušťku řezu a plochu řezu pro svůj alikvot zájmu, jakož i všechny postupy používané v dané laboratoři, aby se získala DNA vhodného množství a kvality pro konkrétní následné aplikace.

Pokud se tato souprava používá spolu s následnou aplikací QIAGEN, pokyny najdete v příslušné příručce.

Nedostatečná dehydratace tkáně při přípravě tkáně FFPE, umístění příliš velkého množství parafínu s alikvotem do extrakční zkumavky, použití etanolu nižší čistoty (nikoliv molekulárně-biologické kvality), než je doporučeno, případně ponechání xylenu nebo etanolu v alikvotu může vést k suboptimální extrakci, nízkému množství DNA a její horší kvalitě.

### Opakovatelnost

Opakovatelnost byla hodnocena pomocí 6 buněčných linií FFPE vytvořených z lidských buněk fixovaných formalínem a zalitých parafínem. Alikvoty byly testovány s master mixem QuantiTect® SYBR® Green a primery specifickými pro gen  $\beta$ -aktin společně s cyklem Rotor-Gene® Q pro real-time PCR. PCR reakce byly provedeny pro fragment 174 bp a pro fragment 218 bp lidského genu  $\beta$ -aktin.

Pro statistickou analýzu bylo použito 72 datových bodů pro každou velikost fragmentu. Statistická analýza zahrnovala výpočet směrodatné odchylky (Standard Deviation, SD) a horní a dolní 95% hranice spolehlivosti. Variace byla odhadnuta pomocí analýzy složek variance jako směrodatná odchylka pro fragment 218 bp (SD: 0,342 CT; spodní 95% hranice spolehlivosti: 0,291; horní 95% hranice spolehlivosti: 0,413). To lze použít jako odhad opakovatelnosti extrakčního procesu. Odhadovaná variace pro fragment 174 bp byla 0,258 CT; spodní 95% hranice spolehlivosti: 0,220; horní 95% hranice spolehlivosti: 0,312.

## Reprodukovatelnost

Hodnocení reprodukovatelnosti bylo provedeno ve třech laboratořích s použitím 3 klinických vzorků FFPE obsahujících nemalobuněčný karcinom plic (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): jeden vzorek s mutací delece 6223, jeden vzorek s mutací L858R a jeden vzorek s divokým typem (Wild-Type, WT). Klinické vzorky FFPE byly vybrány na základě jejich známého stavu mutace podle Sangerovy metody sekvenování.

Pro každý z mutovaných klinických vzorků FFPE bylo 48 sekvenčních řezů FFPE náhodně rozděleno do dvojic pro použití v extrakci a rozděleno do tří dávek, jedna dávka pro každé testovací pracoviště.

Extrakce byly na každém testovacím pracovišti provedeny duplicitně. Každé pracoviště použilo k extrakci jednu jedinečnou šarži soupravy QIAamp FFPE DNA DSP Kit. Na všech třech pracovištích bylo hodnocení alikvotů i hodnocení mutací provedeno pomocí soupravy *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit. Alikvoty byly testovány ve 3 na sebe nenavazujících dnech během 6denního období. Každý vzorek byl na každém pracovišti testován 6krát, což představuje celkem 18 datových bodů na jeden vzorek.

Na všech třech pracovištích byly u všech alikvotů prokázány 100% správné hodnoty mutací.

## Linearita

Soupravu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit lze použít k izolaci DNA z různých typů tkání. Lineární rozsah by měl být stanoven podle požadavků zákazníka a validován pro konkrétní použití. U různých typů tkání se očekávají různé lineární rozsahy v závislosti na zatížení tkáně v systému a také na vlastnostech tkáně.

## Interferující látky

Soupravu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit lze použít k izolaci DNA z různých typů tkání. Potenciálně interferující látky mohou pocházet z různých zdrojů, například z přirozených metabolitů specifických pro daný typ tkáně a orgánu, metabolitů vznikajících při patologických stavech, látek zavedených během léčby pacienta anebo látek požitých pacientem.

Testování interferujících látek bylo provedeno pomocí soupravy QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit pro přípravu alikvotů ve spojení s příkladnými následnými aplikacemi pro posouzení kvality extrahovaných nukleových kyselin. Příklady testovaných diagnostických souprav QIAGEN jsou uvedeny v tabulce 1.

Různé následné aplikace však mohou mít různé požadavky na čistotu (tj. nepřítomnost potenciálních interferujících látek) a interferující látky přítomné v konkrétním alikvotu mohou být odlišné. Proto musí být identifikace, testování a kontrola příslušných interferujících látek rovněž stanovena jako součást konkrétního diagnostického pracovního postupu, zahrnujícího soupravu QIAamp DSP FFPE Tissue Kit, a konkrétní následné aplikace.

**Tabulka 1. Studie interferujících látek v následných analýzách**

Diagnostická souprava	Testované interferující látky	Závěr
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Parafinový vosk Xylen Etanol Buffer ATL Proteináza K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobin	K pěti alikvotům s mutacemi (každý z nich reprezentuje jednu analýzu v soupravě PIK3CA Kit) a jednomu alikvotu WT bylo přidáno 9 potenciálních interferujících látek. Poté byl testován vliv těchto interferujících látek na průměrnou hodnotu $\Delta Ct$ a stanovení mutací.  Údaje z této studie ukazují, že testované interferující látky neměly v použitých koncentracích žádný účinek na mutantní alikvoty ani alikvoty WT. Pokud byl pozorován významný rozdíl, byl tento rozdíl v rámci 3násobné mezilehlé preciznosti analýzy, a tedy v rámci inherentní variability analýzy.  Všechna stanovení mutací u mutantních alikvotů i alikvotů WT odpovídala očekávání. Údaje získané z této studie ukazují, že studie splnila kritéria přijatelnosti.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Parafinový vosk Xylen Etanol Buffer ATL Proteináza K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Cílem této studie bylo vyhodnotit vliv potenciálních interferujících látek na funkční vlastnosti soupravy KRAS Kit.  U alikvotů s mutacemi bylo cílem prokázat, že průměrné hodnoty analýzy u alikvotů s interferující látkou se významně neliší od hodnot u alikvotů bez interferující látky. U alikvotů WT bylo cílem prokázat, že přítomnost interferující látky by neměla způsobit falešně pozitivní výsledky.  Byly zjištěny dvě kombinace analýzy a interferující látky, které vedly k falešně pozitivním výsledkům. V obou případech se však jednalo o nízkou hladinu xylenů bez srovnatelných falešně pozitivních výsledků v alikvotech s vysokou hladinou xylenů.  Oba uvedené cíle byly splněny, což potvrzuje hypotézu, že žádná látka ze soupravy QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit v koncentracích, které se běžně používají, neinterferuje se schopností soupravy KRAS Kit rozlišovat mezi alikvoty pozitivními a negativními na mutaci.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Parafinový vosk Xylen Etanol Buffer ATL Proteináza K Buffer AW1 Buffer AW2	Cílem této studie bylo ověřit vliv potenciálních interferujících látek použitých v procesu extrakce na funkční vlastnosti soupravy <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) při použití na platformě QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Platform (RGQ).  Pro tuto studii bylo vybráno osm standardních alikvotů FFPE reprezentujících každou ze 7 analýz mutací soupravy EGFR a jeden alikvot divokého typu (wild-type, WT).  Odhadované rozdíly ve středních hodnotách $\Delta Ct$ pro každý z mutantních standardů FFPE mezi každou ze dvou úrovní interferujících látek a „slepými“ replikáty se buď významně nelišily od nuly, nebo byly považovány za nízké s hodnotou menší než 1 Ct.  U všech mutantních replikátů byla detekována mutace při nízké i vysoké koncentraci interferujících látek, a to u všech interferujících látek. U všech replikátů WT byl stav mutace alikvotu při nízké i vysoké koncentraci interferujících látek „mutace nebyla detekována“, a to u všech interferujících látek.  Studie potvrdila, že reagentie použité v soupravě pro extrakci FFPE (FFPE Extraction Kit) neovlivňují funkční vlastnosti soupravy EGFR Kit.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Parafinový vosk Xylen Etanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Cílem této studie bylo prokázat, že přítomnost potenciálně interferující látky (ze soupravy QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE Extraction Kit)) nezpůsobí žádné falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky pro soupravu KRAS System NSCLC Kit. To znamená, že by stanovení mutace bylo ovlivněno nebo by došlo k „zabezpečení“ systému tím, že bude vykazovat neplatný stav alikvotu.  Z procesu extrakce DNA bylo identifikováno osm potenciálně interferujících látek. Každá látka byla testována na 8 buněčných liniích FFPE, které reprezentují každou ze 7 mutací detekovaných soupravou KRAS Kit NSCLC Kit, a na alikvotu WT. Alikvoty s mutacemi byly testovány na úrovni odpovídající přibližně 3násobku limitu detekce ( $3 \times LOD$ ).  Studie prokázala, že testované látky nemají žádný nepříznivý vliv na funkční vlastnosti analýzy na $1 \times$ úrovni interferující látky: vždy byla detekována a stanovena správná mutace. Přítomnost interferující látky neměla statisticky významný vliv na rozdíl v hodnotě $\Delta Ct$ u většiny testovaných podmínek alikvotů (58 z 64 podmínek, na $1 \times$ úrovni). U 6 alikvotů, které vykazovaly statisticky významný rozdíl, byl zjištěný rozdíl průměru pro každý alikvot v rámci kritéria přijatelnosti studie $\pm 2 \times SD$ (odhad SD převzatý ze zprávy ze studie opakovatelnosti a reprodukovatelnosti).  Studie rovněž prokázala, že analýza je tolerantní k vyšším koncentracím každé z látek, než je očekávaný přenos, tj. stanovení mutace bylo správné, i když byla interferující látka přítomna v 10násobku nejvyšší očekávané koncentrace.

Další informace o interferujících látkách v konkrétních návazných aplikacích QIAGEN naleznete v příručkách k soupravám.

## Křížová kontaminace

K posouzení úrovně křížové kontaminace byly použity dva alikvoty buněčné linie NSCLC, FFPE: WT a alikvot buněčné linie FFPE s mutací L858R v exonu 21. Cílem studie bylo simulovat situaci, kdy alikvoty obsahující vysokou hladinu mutací mohou během postupu extrakce křížově kontaminovat jiné alikvoty. Purifikace DNA byla provedena za účelem ověření postupu prostřednictvím purifikace DNA z alikvotů s mutací L858R, umístěných vedle alikvotů WT, přičemž byla použita jedna šarže reagentů. Křížová kontaminace byla posouzena pomocí soupravy *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Výsledky prokázaly, že v celém systému nedošlo k žádné křížové kontaminaci.

## Funkční vlastnosti eluátu QIAamp DSP DNA FFPE DNA v analýzách založených na Pyrosequencing® a qPCR

DNA izolovaná z tkáně FFPE byla naředěna na koncentraci DNA 2 ng/μl pro analýzu pomocí *therascreen* EGFR Pyro. Ve všech cyklech použitých pro stanovení charakteristiky funkčních vlastností byl signál vyšší než 30 RLU (relative light unit, relativní světelné jednotky) pro všechny kodony. Všechny alikvoty měly správný medicínský výsledek pro analýzu mutací.

DNA izolovaná z tkáně FFPE pacientů s kolorektálním karcinómem, nemalobuněčným karcinómem plic a karcinómem prsu byla použita přímo v soupravách *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit a *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Hodnoty Ct pro DNA extrahovanou pomocí soupravy QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit byly v rámci parametrů pracovního rozsahu, které se definují pro jednotlivé analýzy a jsou podrobně popsány v příslušných příručkách.





## Stabilita eluátů

Stabilita eluátů bude záviset na obsahu a typu společně purifikovaných nečistot (vzhledem k typu tkáně), elučním objemu a podmínkách skladování. Doporučujeme, aby uživatelé stanovili eluční stabilitu podle svých konkrétních požadavků.

Pokud se tato souprava používá spolu s následnou aplikací QIAGEN, pokyny naleznete v příslušné příručce soupravy. Příkladná studie ověření stability prokázala, že DNA extrahovaná z alikvotů tkáně FFPE je vhodná pro použití se soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, pokud je skladována maximálně 7 dní při teplotě 4 °C s dalším skladováním při teplotě -20 °C po dobu celkem až pěti týdnů; vícenásobné cykly zmrazení/rozmrazení jsou možné.

## Symboly

V tomto dokumentu se vyskytují následující symboly. Úplný seznam symbolů použitých v návodu k použití nebo na obalu a označení naleznete v příručce.

Symbol	Definice symbolu
	Tento výrobek splňuje požadavky evropského nařízení 2017/746 pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro.
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Katalogové číslo
Rn	R označuje revizi návodu k použití a n je číslo revize
	Výrobce

## Historie revizí

Revize	Popis
R1, červen 2022	<p>Verze 2, revize 1</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Aktualizace na verzi 2 kvůli souladu s nařízením IVDR</li><li>• Přidány oddíly Interferující látky, Křížová kontaminace, Stabilita eluátů a Kompatibilita s následnými aplikacemi</li></ul>

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro soupravu QIAGEN nebo v uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo si je lze vyžádat od technické podpory společnosti QIAGEN či místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.



