

Caratteristiche delle prestazioni RNeasy[®] DSP FFPE Kit

Versione 2

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con RNeasy DSP FFPE Kit

CE

REF

73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1

Le caratteristiche delle prestazioni sono disponibili in via elettronica nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com

Introduzione generale

Il RNeasy DSP FFPE Kit è destinato alla purificazione manuale dell'RNA totale da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Questo prodotto è destinato all'uso da parte di utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle tecniche di biologia molecolare. Utilizza un protocollo basato su colonna spin di silice ottimizzato e include la rimozione enzimatica del DNA residuo.

Il RNeasy DSP FFPE Kit isola le molecole di RNA più lunghe di 70 nucleotidi e consente di recuperare i frammenti di RNA utilizzabili per le applicazioni a valle, come RT-PCR.

Resa del RNA purificato

Le prestazioni di base del RNeasy DSP FFPE Kit sono state valutate utilizzando campioni FFPE di 5 diversi tessuti umani (seno, colon, polmone, melanoma e pelle normale; 20 campioni ciascuno).

I 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 RNA 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 a valle nel proprio laboratorio.

Se il kit viene utilizzato unitamente a un'applicazione QIAGEN® a valle, per le istruzioni consultare il manuale del kit pertinente.

Un'insufficiente disidratazione dei tessuti durante la preparazione dei tessuti FFPE, l'aggiunta di una quantità eccessiva di paraffina al 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 etanolo può comportare un'estrazione inferiore a quella ottimale e una bassa quantità di RNA o prestazioni ridotte a valle.

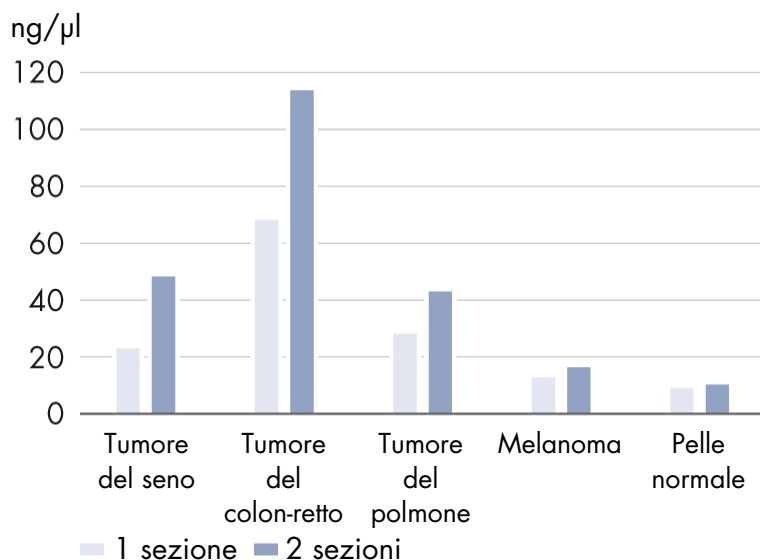


Figura 1. Rese di RNA da diversi tessuti umani (volume di eluizione 32 µl).

Analisi a valle

Il RNA eluito può essere utilizzato in esami downstream. Per valutare le prestazioni, 10 ng di RNA sono stati isolati con il RNeasy DSP FFPE Kit da 5 diversi tessuti umani (seno, colon, polmone, melanoma e pelle normale; 20 campioni comprendenti una o due sezioni) e validati mediante RT-PCR mirata al gene umano β -actin. L'amplificazione è riuscita, dimostrando che l'RNA isolato con il RNeasy DSP FFPE Kit può essere utilizzato per le analisi a valle.

L'utente dovrebbe ottimizzare il numero, lo spessore e l'area superficiale delle sezioni per il proprio campione di interesse e per tutte le successive procedure impiegate in laboratorio, oppure fare riferimento alle prestazioni specifiche del relativo esame downstream.

	Tumore del seno	Tumore del colon-retto	Tumore del polmone	Melanoma	Pelle normale
RT-PCR 1 sezione	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 sezioni	✓	✓	✓	✓	✓

Figura 2. Amplificazione RT-PCR riuscita di sezioni FFPE da 10 μ m derivate da cinque diversi tessuti umani analizzati.

Stabilità degli eluiti

La stabilità degli eluiti 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 degli eluiti in base alle proprie esigenze specifiche.

La stabilità degli eluiti è stata analizzata per i campioni di RNA umano derivati da FFPE e conservati tra -15 e -30°C e tra -60 e -90°C . Non è stato osservato alcun deterioramento fino a 12 settimane e gli eluiti conservati a temperatura ambiente (18 – 25°C) sono rimasti stabili fino a 12 ore. Tutte le condizioni sono state valutate tramite la RT-PCR rivolta al gene umano β -actin.

Se il kit viene utilizzato unitamente ad applicazioni QIAGEN a valle, per le istruzioni consultare il manuale del kit pertinente.

Ripetibilità

La ripetibilità è stata valutata utilizzando campioni FFPE di cellule ematiche umane nucleate. I campioni sono stati analizzati con un esame validato internamente per un frammento di 295 bp del gene umano β -actina su un termociclatore ABI® 7900 per real-time PCR.

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati 108 punti di dati provenienti da tre lotti di estrazione (stesso lotto di kit, operatore e giorno). L'analisi statistica ha incluso il calcolo della deviazione standard (standard deviation, SD) e del coefficiente di variazione (coefficient of variation, CV) dei valori C_T derivati dalla β -actina RT-PCR. La SD era di 1,1 C_T e il CV era di 4,1% (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati di ripetibilità

	Ripetibilità		
	C _T medio	DS	CV (%)
Lotto 1	26,64	1,01	3,81
Lotto 2	27,51	1,16	4,2
Lotto 3	27,23	0,95	3,5
Lotto 1 + 2 + 3	27,13	1,11	4,07

Riproducibilità

La riproducibilità è stata eseguita valutando le estrazioni di RNA da campioni FFPE di cellule ematiche umane nucleate con operatori diversi, in giorni diversi e con operatori in giorni diversi. I campioni sono stati analizzati con un esame validato internamente per un frammento di 295 bp del gene umano β -actina su un termociclatore ABI 7900 per real-time PCR. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati 108 punti di dati provenienti da tre lotti di estrazione per ogni impostazione di prova. L'analisi statistica ha incluso il calcolo della SD e del coefficiente di variazione (coefficient of variation, CV) dei valori C_T derivati dalla β -actina RT-PCR (Tabella 2).

Tabella 2. Risultati di riproducibilità

	Ripetibilità		
	C _T medio	DS	CV (%)
Operatori diversi	26,92	1,06	3,95
Giorni diversi	26,56	1,20	4,53
Operatori e giorni diversi	26,63	1,01	3,78

Linearità di immissione del campione

Il RNeasy DSP FFPE Kit può essere utilizzato per l'isolamento dell'RNA da diversi tipi di tessuti FFPE. Il sistema è stato validato per l'uso di 1–4 sezioni di cellule ematiche umane nucleate FFPE e ha mostrato un aumento lineare della resa di RNA. 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 e degli esami downstream.

Sostanze interferenti

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 un metodo di controllo dell'interferenza nella propria specifica applicazione diagnostica a valle.

Non sono state osservate sostanze interferenti derivanti dai componenti del RNeasy DSP FFPE Kit durante il trattamento dei campioni e l'estrazione dell'RNA.



















Per maggiori informazioni sulle sostanze interferenti in specifiche applicazioni QIAGEN a valle, consultare i manuali dei kit.

Contaminazione crociata

Per valutare il livello di contaminazione crociata, 500 ng di RNA totale da sangue sono stati aggiunti nella soluzione di deparaffinazione e isolati accanto a provette non contenenti RNA (provette negative per l'estrazione). Lo studio aveva lo scopo di simulare la situazione in cui campioni contenenti un elevato livello di molecole target di RNA possono provocare la contaminazione crociata di altri campioni nel corso della procedura di estrazione. La purificazione dell'RNA è stata condotta utilizzando un lotto di reagenti. La contaminazione crociata è stata valutata tramite la RT-PCR rivolta al gene umano β -actin. I risultati non hanno mostrato alcuna contaminazione crociata nell'intero sistema.

Simboli

I seguenti simboli compaiono nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni
	Data di scadenza
	Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Al momento della consegna
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale (vale a dire l'etichetta del componente)
	Componenti (vale a dire un elenco di tutto ciò che è incluso)
	Contiene (contenuto)
	Numero (ad esempio fiale, flaconi)
	Codice GTIN (Global Trade Item Number)
Rn	"R" indica la revisione delle Istruzioni per l'uso (manuale) e "n" indica il numero della revisione
	Limite di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Cautela

Simbolo**Definizione del simbolo****PROTK**

Proteinasi K

Sodium azide

Azide di sodio

UDI

UDI (identificatore univoco del dispositivo)

Cronologia delle revisioni del documento

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	Versione IVDR

Per informazioni aggiornate sulle licenze e sulle esclusioni di responsabilità specifiche del prodotto, vedere il manuale del kit QIAGEN o il manuale dell'utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, RNeasy® (QIAGEN Group); ABI® (Life Technologies Corporation). I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.

06/2022 HB-3027-D01-001 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

