

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit - Bruksanvisning (Prestandaegenskaper)

Version 2



För in vitro-diagnostisk användning
För användning med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1

Prestandaegenskaper finns tillgängliga elektroniskt under resursfliken på produktsidan på www.qiagen.com.

Allmän introduktion

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit är ett system där kiselmembransteknik (QIAamp-teknik) används för isolering och rening av genomiskt DNA från formalinfixerade, paraffinbäddade (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) biologiska prover.

Det är avsett för manuell provberedning och ger inga testresultat, varken kvalitativa eller kvantitativa.

Prestandaegenskaper

Obs! Prestandaegenskaper beror i hög grad på olika faktorer och relaterar till den specifika nedströmsapplikationen. De har fastställts för QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit i kombination med exemplifierande FFPE-inbäddade vävnadstyper och exemplifierande nedströmsapplikationer. Metoder för att isolera nukleinsyror används emellertid tillsammans med olika biologiska prover och som en front-end för flera nedströmsapplikationer. Prestandaparametrar som korskontaminering eller repeterbarhet och reproducerbarhet måste fastställas för ett sådant arbetsflöde som en del av nedströmsapplikationsutvecklingen. Därför är det användarens ansvar att validera hela arbetsflödet för att fastställa lämpliga prestandaparametrar.

Grundläggande prestanda och kompatibilitet med olika nedströmsapplikationer

Nedströmsanalys

Eluerat genomiskt DNA är klart att använda i olika nedströmsanalyser, däribland olika in vitro-diagnostiska nedströmsanalyser. Se relevant QIAGEN®-satshandbok för mer information om specifik systemprestanda.

Utbyte av renat DNA

Formalinfixerade, paraffinbäddade (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) prover kan uppvisa en hög grad av vävnadsheterogenitet. Dessutom är vävnadsytan mycket varierande i FFPE-prover, vilket leder till varierande kvantitet och kvalitet på extraherat DNA. Därför bör användaren optimera antalet sektioner, sektionstjocklek och sektionsyta för sitt prov av intresse och alla förfaranden som används i deras laboratorium för att erhålla DNA av lämplig kvantitet och kvalitet för de specifika nedströmsapplikationerna.

Om satsen används tillsammans med en QIAGEN-nedströmsapplikation, se relevant handbok för instruktioner.

Otillräcklig vävnadsuttorkning under FFPE-vävnadsberedning, placering av för mycket paraffin tillsammans med provet i extraktionsröret, användning av etanol med lägre renhet (ej molekylärbioologisk kvalitet) än vad som rekommenderas eller kvarhållande av xylen eller etanol i provet kan leda till suboptimal extraktion och låg DNA-kvantitet och -kvalitet.

Repeterbarhet

Repeterbarheten utvärderades med användning av 6 FFPE-cellinjer genererade från humana celler fixerade i formalin och inbäddade i paraffin. Proverna testades med QuantiTect® SYBR® Green-masterblandning och β -aktingspecifika primers tillsammans med Rotor-Gene® Q real-time PCR-cykler. PCR-reaktioner utfördes för ett 174 bp-fragment och för ett 218 bp-fragment av den humana β -aktningen.

För den statistiska analysen användes 72 datapunkter för varje fragmentstorlek. Den statistiska analysen inkluderade beräkningen av standardavvikelsen (Standard Deviation, SD) och högre och lägre 95 % konfidensgränser. Variationen uppskattades med användning av varianskomponentanalys som standardavvikelse för 218 bp-fragmentet (SD: 0,342 CT; lägre 95 % konfidensgräns: 0,291; högre 95 % konfidensgräns: 0,413). Detta kan användas som en uppskattning av repeterbarheten för extraktionsprocessen. Den uppskattade variationen för 174 bp-fragment var 0,258 CT; lägre 95 % konfidensgräns: 0,220; högre 95 % konfidensgräns: 0,312.

Reproducerbarhet

Bedömning av reproducerbarhet utfördes i tre laboratorier med 3 kliniska FFPE-prover innehållande icke-småcellig lungcancervävnad (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): ett med en 6223-borttagningsmutation, ett med en L858R-mutation och ett med ett vildtypsprov (Wild-Type, WT). De kliniska FFPE-proverna valdes på basis av deras kända mutationsstatus enligt Sanger-sekvensering.

För vart och ett av de mutanta kliniska FFPE-proverna randomiserades 48 sekventiella FFPE-sektioner till par för att användas i en extraktion och delades upp i tre satser, en sats per testplats.

Extraktioner utfördes i duplikat på respektive testplats. Varje plats använde en unik lot av QIAamp FFPE DNA DSP Kit för extraktion. Provbedömning och mutationsbedömning utfördes med hjälp av *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit på alla tre platserna. Prover testades under 3 icke på varandra följande dagar under en period på 6 dagar. Varje prov testades 6 gånger på varje plats, vilket gav totalt 18 datapunkter per prov.

För alla prover, på alla tre platserna, uppvisades 100 % korrekta mutationsbestämningar.

Linjäritet

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan användas för isolering av DNA från olika typer av vävnad. Ett linjärt område bör fastställas enligt kundens krav och valideras för den specifika användningen. Olika linjära områden förväntas för olika vävnadstyper, beroende på vävnadsbelastningen i systemet, såväl som vävnadsegenskaper.

Interfererande ämnen

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan användas för isolering av DNA från olika typer av vävnad. Potentiellt interfererande substanser kan härröra från olika källor, exempelvis naturliga metaboliter specifika för vävnadstypen och organet, metaboliter som produceras under patologiska tillstånd, substanser som introduceras under patientbehandlingen eller substanser som patienten intar.

Testning av interfererande substanser har utförts med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit för provberedning tillsammans med exemplifierande nedströmsapplikationer för en bedömning av kvaliteten på de extraherade nukleinsyror. Exempel på testade diagnostiska QIAGEN-satser finns listade i Tabell 1.

Olika nedströmsapplikationer kan emellertid ha olika krav med avseende på renhet (d.v.s. frånvaro av potentiellt interfererande substanser) och interferenterna som finns i det specifika provet kan skilja sig åt. Därför måste identifiering, testning och kontroll av relevanta interfererande substanser också fastställas som en del av det specifika diagnostiska arbetsflödet som involverar QIAamp DSP FFPE Tissue Kit och den specifika nedströmsapplikationen.

Tabell 1. Studie av interfererande substanser vid nedströmsanalys

Diagnostisk sats	Testade interferenter	Slutsats
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Paraffinvax Xylen Etanol Buffer ATL Proteinas K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobin	Fem mutanta prover (var och ett representerande en av analyserna i PIK3CA Kit) och ett WT-prov spetsades med 9 potentiellt interfererande substanser och testades för deras effekt på medelvärdet för ΔC_t och mutationsbestämning. Data från denna studie visar att de testade interferenterna inte hade någon effekt på mutanta prover eller WT-prover vid de använda koncentrationerna. Där en signifikant skillnad observerades var denna inom 3x variationer inom laboratoriet för analysen och således inom analysens normala variation. Alla mutationsbestämningar i både mutanta prover och WT-prover var som förväntade. De data som observerades i den här studien visar att studien uppfyllde acceptanskriterierna.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Paraffinvax Xylen Etanol Buffer ATL Proteinas K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Den här studien utformades för att utvärdera effekterna av potentiellt interfererande substanser på prestandan hos KRAS-satsen. För mutanta prover var målet att visa att medelvärdena för analysen i prover med en interfererande substans inte skiljde sig signifikant från de utan den interfererande substansen. För WT-prover var målet att visa att förekomsten av en potentiellt interfererande substans inte bör orsaka falskt positiva resultat. Det fanns två kombinationer av analys/interfererande substanser som resulterade i falskt positiva resultat. Dessa var dock båda med låg nivå av xylen utan jämförbara falska positiva resultat i proverna med hög nivå. Båda dessa mål uppfylldes, vilket bekräftar hypotesen att ingen substans från QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit vid dessa koncentrationer under normal användning stör förmågan hos KRAS-satsen att skilja mellan mutationspositiva och mutationsnegativa prover.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Paraffinvax Xylen Etanol Buffer ATL Proteinas K Buffer AW1 Buffer AW2	Syftet med denna studie var att verifiera effekten av potentiellt interfererande substanser som används i extraktionsprocessen på prestandan hos <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) vid användning på QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Platform (RGQ). Åtta FFPE-standardprover representerande var och en av de 7 EGFR-mutationsanalyserna plus en vildtyp (Wild-Type, WT) valdes för denna studie. De uppskattade skillnaderna i genomsnittliga ΔC_t -värden för var och en av de muterade FFPE-standarderna mellan var och en av de två nivåerna av interferenter och "Blank"-replikaten var antingen inte signifikant olika från noll eller ansågs små med ett värde på mindre än 1Ct. Alla mutanta replikat hade en mutationsbestämning för mutation som detekterades vid var och en av de låga och höga interferensnivåerna för alla interferenter. Alla WT-replikaten hade en provmutationsstatus för mutation som detekterades vid var och en av de låga och höga interferensnivåerna för alla interferenter. Studien bekräftade att reagenserna som används i FFPE Extraction Kit inte påverkar prestandan hos EGFR Kit.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Paraffinvax Xylen Etanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Studien utformades för att visa att förekomsten av en potentiellt interfererande substans (från QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE Extraction Kit)) inte skulle producera några falskt positiva eller falskt negativa resultat för KRAS System NSCLC Kit, det vill säga att mutationsbestämningen skulle påverkas eller göra att systemet blir "felsäkert" genom att producera en ogiltig provstatus. Åtta potentiellt interfererande substanser från DNA-extraktionsprocessen identifierades. Varje substans testades mot 8 FFPE-celler, representerande var och en av de 7 mutationerna detekterade av KRAS Kit NSCLC Kit, samt ett WT-prov. Mutationsproverna testades på en nivå som motsvarar ungefär 3 ggr detektionsgränsen (3 x LoD). Studien visade att de testade substanserna inte hade någon negativ effekt på analysens prestanda vid 1x-nivån av interferent. Den korrekta mutationsbestämningen användes alltid och förekomsten av den interfererande substansen hade ingen statistiskt signifikant effekt på skillnaden i ΔC_t för majoriteten av provförhållandena som testades (58 av 64 förhållanden, vid 1x-nivå). För de 6 prover som visade en statistiskt signifikant skillnad låg den observerade skillnaden i medelvärdena för varje prov inom studiens acceptanskriterium på $\pm 2 \times SD$ (SD-uppskattning hämtad från studierapporten om repeterbarhet och reproducerbarhet). Studien visade också att analysen var mer tolerant mot högre nivåer av var och en av substanserna än den förväntade överföringen, dvs. korrekta mutationsbestämningar gavs när den interfererande substansen förekom med 10x så hög nivå som den högsta förväntade koncentrationen.

Se satshandböckerna för mer information om interfererande substanser i specifika QIAGEN-nedströmsapplikationer.

Korskontaminering

För att bedöma graden av korskontaminering användes två FFPE-cellinje-NSCLC-prover: WT- och FFPE-cellinje prov innehållande exon 21 L858R-mutationen. Studien syftade till att efterlikna en situation där prover som innehåller en hög mutationsnivå kan korskontaminera andra prover under extraktionsförfarandet. DNA-rening utfördes för att utmana proceduren genom att rena DNA från L858R-mutanta prover placerade bredvid WT-prover, med användning av en reagenslot. Korskontamineringen utvärderades med användning av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Resultaten visade ingen korskontamination någonstans i systemet.

QIAamp DSP DNA FFPE DNA-eluatprestanda i Pyrosequencing®- och qPCR-baserade analyser

DNA isolerat från FFPE-vävnad späddes till en DNA-koncentration av 2 ng/µl för analys med användning av *therascreen* EGFR Pyro Assay. I alla körningar som användes för bestämning av prestandaegenskaper var signalen över 30 RLU (relativa ljusenheter) för alla kodoner och alla prover hade ett korrekt medicinskt resultat för mutationsanalysen.

DNA isolerat från FFPE-vävnad från patienter med kolorektal cancer, icke-småcellig lungcancer och bröstcancer användes direkt i *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Ct-värdena för DNA som extraherats med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit låg inom arbetsintervallparametrarna som definierats för varje analys och beskrivs i respektive handböcker.





Eluatstabilitet

Eluatstabiliteten beror på innehållet och typen av samrenade föroreningar (relaterade till vävnadstyp), elueringsvolym och förvaringsförhållanden. Vi rekommenderar att användare fastställer eluatstabiliteten enligt deras specifika krav.

Om satsen används tillsammans med en QIAGEN-nedströmsapplikation, se relevant satshandbok för instruktioner. En exemplifierande stabilitetsverifieringsstudie har visat att DNA extraherat från FFPE-vävnadsprover är lämpligt för användning med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit när det förvaras i upp till 7 dagar vid 4 °C, med ytterligare förvaring vid -20 °C i upp till sammanlagt fem veckor med flera frysnings-/upptiningscykler.

Symboler

Följande symboler förekommer i detta dokument. För en fullständig lista över symboler som används i bruksanvisningen eller på förpackningen och märkningen, se handboken.

Symbol	Symbolförklaring
	Den här produkten uppfyller kraven i Europeisk Regel 2017/746 för in vitro-diagnostiska medicintekniska enheter.
	In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet
	Katalognummer
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen och n är revisionsnumret
	Tillverkare

Revisionshistorik

Revision	Beskrivning
R1, juni 2022	<p>Version 2, Revision 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Uppdatera till version 2 för överensstämmelse med IVDR• Avsnitt för interfererande substanser, korskontaminering, eluatstabilitet och kompatibilitet med nedströmsapplikationer tillagda

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-satshandbok eller -användarmanual. Handböcker och användarmanualer för QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com, eller så kan de beställas från QIAGEN:s tekniska service eller din lokala återförsäljare.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Registrerade namn, varumärken med mera som används i detta dokument ska inte anses som oskyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, med ensamrätt.

