

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

Brugsanvisning (ydelseskarakteristik)

Version 2

IVD

Til in vitro-diagnostisk brug

Til brug sammen med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

CE

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1

Ydelseskarakteristik er tilgængelige i digital form og kan findes på fanen Resource (Ressource) på siden Product (Produkt) på www.qiagen.com.

Generel introduktion

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit er et system, der anvender silicamembranteknologi (QIAamp-teknologi) til isolering og oprensning af genomisk DNA fra formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) biologiske prøver.

Det er beregnet til manuel prøveklargøring og leverer ingen testresultater, hverken kvalitative eller kvantitative.

Ydelseskarakteristik

Bemærk: Ydelseskarakteristik afhænger i høj grad af forskellige faktorer og relaterer sig til den specifikke efterfølgende anvendelse. De er blevet fastlagt for QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit i forbindelse med eksemplariske FFPE-indlejrde vævstyper og eksemplariske efterfølgende anvendelser. Metoder til isolering af nukleinsyrer bruges dog sammen med forskellige biologiske prøver og som udgangspunkt for flere efterfølgende anvendelser. Ydelsesparametre såsom krydskontaminering eller kørselsreperterbarhed og -reproducerbarhed skal fastlægges for enhver sådan arbejdsgang som en del af udviklingen af den efterfølgende anvendelse. Det er derfor brugerens ansvar at validere hele arbejdsgangen for at oprette de relevante ydelsesparametre.

Grundlæggende ydelse og kompatibilitet med efterfølgende anvendelser

Efterfølgende analyse

Det eluerede genomiske DNA er klar til brug i forskellige efterfølgende analyser, herunder forskellige efterfølgende in vitro-diagnostiske analyser. Se den relevante QIAGEN® kit-håndbog for yderligere oplysninger om specifik systemydelse.

Udbytte af oprenset DNA

Formalinfikserede, paraffinindlejrde (FFPE)-prøver kan udvise en høj grad af vævsheterogenitet. Derudover er vævsoverfladearealet meget variabelt i FFPE-prøver, hvilket fører til variabel kvantitet og kvalitet af ekstraheret DNA. Derfor bør brugeren optimere antallet af sektioner, snittykkelse og sektionens overfladeareal for deres prøve af interesse og alle procedurer, der anvendes i deres laboratorium, for at opnå DNA af egnet kvantitet og kvalitet til de specifikke efterfølgende anvendelser.

Hvis kittet bruges sammen med en efterfølgende QIAGEN-anvendelse, skal du se den relevante håndbog for vejledning.

Utilstrækkelig vævsdehydrering under FFPE-vævsklargøring, anbringelse af for meget paraffin med prøven til ekstraheringsrøret, brug af ethanol af en lavere renhed (ikke molekylærbiologi-grad) end anbefalet, eller bevarelse af xylen eller ethanol i prøven kan føre til suboptimal ekstrahering og lav DNA-kvantitet og -kvalitet.

Reperterbarhed

Reperterbarhed blev evalueret ved brug af 6 FFPE-cellelinjer genereret fra humane celler fikseret i formalin og indlejret i paraffin. Prøverne blev testet med QuantiTect® SYBR® Green-mastermix og β -actin-specifikke primere sammen med Rotor-Gene® Q real-time PCR-cykluser. PCR-reaktioner blev udført for et 174 bp-fragment og for et 218 bp-fragment af det humane β -actin.

Til den statistiske analyse blev der brugt 72 datapunkter for hver fragmentstørrelse. Statistisk analyse inkluderede beregningen af standardafvigelsen (SD) og øvre og nedre 95 % konfidensgrænser. Variationen blev estimeret ved hjælp af varianskomponentanalyse som standardafvigelsen for 218 bp-fragmentet (SD: 0,342 CT – nedre 95 % konfidensgrænse: 0,201 – øvre 95 % konfidensgrænse: 0,413). Dette kan bruges som et estimat af reperterbarhed for ekstraheringsprocessen. Variation estimeret for 174 bp-fragment var 0,258 CT – nedre 95 % konfidensgrænse: 0,220 – øvre 95 % konfidensgrænse: 0,312.

Reproducerbarhed

Vurdering af reproducerbarhed blev udført på tværs af tre laboratorier ved hjælp af 3 kliniske FFPE-prøver indeholdende ikke-småcellet lungecancer (NSCLC)-væv: en med en deletion 6223-mutation, en med en L858R-mutation og en med en vildtype (WT)-prøve. De kliniske FFPE-prøver blev udvalgt på basis af deres kendte mutationsstatus i henhold til Sanger-sekventering.

For hver af de mutante kliniske FFPE-prøver blev 48 sekventielle FFPE-sektioner randomiseret i par, der skulle bruges i en ekstrahering og opdelt i tre batches, en batch pr. teststed.

Ekstraheringer blev foretaget i duplikater på hvert teststed. Hvert sted brugte et unikt lot af QIAamp FFPE DNA DSP Kits til ekstrahering. Prøvevurdering og mutationsvurdering blev udført ved hjælp af *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit på tværs af alle tre steder. Prøver blev testet på 3 ikke på hinanden følgende dage over en periode på 6 dage. Hver prøve blev testet 6 gange på hvert sted, hvilket gav i alt 18 datapunkter pr. prøve.

For alle prøver, på tværs af alle tre steder, blev der påvist 100 % korrekte mutationsbestemmelser.

Linearitet

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan anvendes til isolation af DNA fra forskellige typer væv. Der bør fastlægges et lineært område i henhold til kundens krav, og det bør valideres til den særlige anvendelse. Forskellige lineære områder forventes for forskellige vævstyper, afhængigt af vævsbelastningen i systemet, samt vævskarakteristik.

Interfererende stoffer

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan anvendes til isolation af DNA fra forskellige typer væv. Potentielt interfererende stoffer kan stamme fra forskellige kilder, f.eks. naturlige metabolitter, der er specifikke for vævstypen og organet, metabolitter dannet under patologiske forhold, stoffer indført i forbindelse med patientbehandling, eller stoffer indtaget af patienten.

Test af interfererende stoffer er blevet udført ved hjælp af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit til prøveklargøring i forbindelse med eksemplariske efterfølgende anvendelser til en vurdering af kvaliteten af de ekstraherede nukleinsyrer. Eksempler på testede diagnostiske QIAGEN-kits er anført i Tabel 1.

Forskellige efterfølgende anvendelser kan dog have forskellige krav med hensyn til renhed (dvs. fravær af potentielle interfererende stoffer), og interferenser til stede i den specifikke prøve kan være forskellige. Derfor skal identifikation, testning og kontrol af relevante interfererende stoffer også fastlægges som en del af den specifikke diagnostiske arbejdsgang, der involverer QIAamp DSP FFPE Tissue Kit og den specifikke efterfølgende anvendelse.

Tabel 1. Undersøgelse af interfererende stoffer ved efterfølgende analyse

Diagnostisk kit	Interfererende stoffer testet	Konklusion
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Paraffinvoks Xylen Ethanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hæmoglobin	Fem mutantprøver (hver repræsenterer en af analyserne i PIK3CA Kit) og en WT-prøve blev tilsat 9 potentielle interfererende stoffer og testet for deres effekt på gennemsnitlig ΔC_t - og mutationsbestemmelse. Dataene fra denne undersøgelse viser, at de testede interfererende stoffer ikke havde nogen effekt på mutant- eller WT-prøver ved de anvendte koncentrationer. Hvor der blev observeret en markant forskel, var dette inden for 3x af analysens mellemprecision og var derfor inden for analysens indbyggede variabilitet. Alle bestemmelser af mutation i både mutant- og WT-prøver var som forventet. De observerede data i denne undersøgelse viser, at undersøgelsen opfyldte godkendelseskriterierne.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Paraffinvoks Xylen Ethanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Denne undersøgelse var designet til at evaluere effekten af potentielt interfererende stoffer på KRAS-kittets ydelse. For mutantprøver var målet at påvise, at de gennemsnitlige analyseværdier i prøver med et interfererende stof ikke afveg signifikant fra dem uden det interfererende stof. For WT-prøver var målet at påvise, at tilstedeværelsen af et interfererende stof ikke ville forårsage falsk positive resultater. Der var to kombinationer af analyse/interfererende stoffer, der resulterede i falsk positive resultater. Disse var imidlertid begge i det lave niveau af xylen uden sammenlignelige falsk positive i prøverne med højt niveau. Begge disse mål blev opfyldt, hvilket bekræfter hypotesen om, at ingen stoffer fra QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit i koncentrationerne ved normal brug interfererer med KRAS-kittets evne til at skelne mellem mutationspositive og mutationsnegative prøver.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Paraffinvoks Xylen Ethanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AW1 Buffer AW2	Formålet med denne undersøgelse var at verificere effekten af potentielt interfererende stoffer, der anvendes i ekstraheringsprocessen, på ydelsen for <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit), når det bruges på QIAGEN Rotor-Gene Q MDx-plattformen (RGQ). Otte FFPE-standardprøver repræsenterende hver af de 7 EGFR-mutationsanalyser plus en vildtype (WT) blev udvalgt til denne undersøgelse. De estimerede forskelle i gennemsnitlige ΔC_t -værdier for hver af mutant-FFPE-standarderne mellem hvert af de to niveauer af interfererende stoffer og "Blank" replikater var enten ikke-signifikant forskellige fra nul eller betragtes som små med en værdi på mindre end 1Ct. Alle mutantreplikater havde en mutationsbestemmelse for detekteret mutation ved hver af de lave og høje niveauer for interfererende stoffer. Alle WT-replikater havde en prøvemutationsstatus for mutation, der ikke blev detekteret ved hver af de lave og høje niveauer for alle interfererende stoffer. Undersøgelsen bekræftede, at de reagenser, der anvendes i FFPE-ekstraheringssættet, ikke påvirker EGFR-kittets ydelse.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Paraffinvoks Xylen Ethanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer AVE	Undersøgelsen var designet til at opvise, at tilstedeværelsen af et potentielt interfererende stof (fra QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE Extraction Kit)) ikke ville skabe falsk positive eller falsk negative resultater for KRAS System NSCLC-kittet. Det vil sige, at mutationsbestemmelsen ville blive påvirket eller få systemet til at gå i "fejlsikret tilstand" ved at producere en ugyldig prøvestatus. Otte potentielt interfererende stoffer fra DNA-ekstraheringsprocessen blev identificeret. Hvert stof blev testet mod 8 FFPE-cellelinjer, der repræsenterer hver af de 7 mutationer, der blev påvist af KRAS Kit NSCLC Kit, og en WT-prøve. Mutationsprøverne blev testet ved et niveau svarende til ca. 3 gange påvisningsgrænsen (3 x LOD). Undersøgelsen viste, at de testede stoffer ikke havde nogen negativ virkning på analysens ydelse ved 1x niveauet af interfererende stoffer – den korrekte mutationsbestemmelse blev altid bestemt, og tilstedeværelsen af det interfererende stof havde ikke en statistisk signifikant effekt på forskellen i ΔC_t på størstedelen af testede prøvebetingelser (58 ud af 64 betingelser, på 1x niveau). For de 6 prøver, der viste en statistisk signifikant forskel, var den observerede forskel gennemsnitlig for hver prøve inden for undersøgelsens godkendelseskriterie på $\pm 2 \times SD$ (SD-estimat taget fra undersøgelsesrapporten om repeterbarhed og reproducerbarhed). Undersøgelsen påviste også, at analysen var tolerant over for højere niveauer af hvert af stofferne end den forventede overførsel, dvs. den korrekte mutationsbestemmelse blev givet, når det interfererende stof var til stede ved 10x den højeste, forventede koncentration.

Se kithåndbøgerne for yderligere oplysninger om interfererende stoffer i specifikke efterfølgende QIAGEN-anvendelser.

Krydskontaminering

For at vurdere niveauet af krydskontaminering blev to FFPE-cellelinje NSCLC-prøver anvendt: WT- og FFPE-cellelinjeprøven med exon 21 L858R-mutationen. Undersøgelsen havde til formål at efterligne den situation, hvor prøver, der indeholder et højt mutationsniveau, kan krydskontaminere andre prøver inden for ekstraheringsproceduren. DNA-oprensning blev udført for at udfordre proceduren ved at oprense DNA fra L858R-mutantprøver placeret ved siden af WT-prøver under anvendelse af ét lot reagenser. Krydskontamineringen blev vurderet ved hjælp af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Resultaterne viste ingen krydskontaminering noget sted i systemet.

QIAamp DSP DNA FFPE DNA-elueringsydelse i Pyrosequencing® og qPCR-baserede analyser

DNA isoleret fra FFPE-væv blev fortyndet til en DNA-koncentration på 2 ng/µl til analyse ved hjælp af *therascreen* EGFR Pyro Assay. I alle kørsler, der blev brugt til bestemmelse af ydelseskarakteristik, var signalet over 30 RLU (relative lysenheder) for alle kodoner, og alle prøver havde et korrekt medicinsk resultat for mutationsanalysen.

DNA isoleret fra FFPE-væv fra patienter med kolorektal cancer, ikke-småcellet lungecancer og brystkræft blev brugt direkte i *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Ct-værdierne for DNA'et ekstraheret ved hjælp af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit lå inden for arbejdsområdet parametre defineret for hver analyse og nærmere beskrevet i de respektive håndbøger.





Eluatstabilitet

Eluatstabiliteten afhænger af indholdet og typen af de samtidigt oprensede urenheder (relateret til vævstype), elueringsmængden og opbevaringsbetingelserne. Vi anbefaler, at brugerne fastlægger den eluatstabilitet, der er påkrævet til deres situation.

Hvis kittet bruges sammen med en efterfølgende QIAGEN-anvendelse, skal du se den relevante håndbog for vejledning. En eksemplarisk undersøgelse om stabilitetsverifikation har påvist, at DNA ekstraheret fra FFPE-vævsprøver er egnet til brug sammen med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, når det opbevares i op til 7 dage ved 4 °C med yderligere opbevaring ved -20 °C i op til i alt fem uger med flere fryse/tø-cykler.

Symboler

De følgende symboler forekommer i dette dokument. For en komplet liste over symboler, der bruges i brugsanvisningen eller på emballagen og mærkningen, henvises til håndbogen.

Symbol	Symboldefinition
	Dette produkt opfylder kravene i EU-direktivet 2017/746 for medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik.
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
Rn	R står for revision af brugsanvisningen, og n står for revisionsnummeret
	Producent

Revisionshistorik

Revision	Beskrivelse
R1, juni 2022	<p>Version 2, revision 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Opdater til version 2 for at overholde IVDR• Tilføjet afsnit om interfererende stoffer, krydskontaminering eluatstabilitet og kompatibilitet med efterfølgende anvendelser

Opdaterede licensoplysninger og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser kan ses i håndbogen eller brugsvejledningen til det aktuelle QIAGEN-kit. Håndbøger og brugervejledninger til QIAGEN-kits kan fås via www.qiagen.com eller rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale forhandler.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, theascreen® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Registrerede navne, varemærker osv. anvendt i dette dokument, selv når de ikke specifikt er markeret som sådan, skal ikke betragtes som værende juridisk ubeskyttede.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

