

Gebruiksaanwijzing (Prestatiekenmerken) QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

Versie 2



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor gebruik in combinatie met QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Duitsland

R1

De prestatiekenmerken zijn in elektronische vorm beschikbaar. U kunt deze vinden onder het tabblad 'Resources' (Hulpmiddelen) van de productpagina op www.qiagen.com.

Algemene inleiding

De QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit is een systeem voor isolatie en zuivering van genomisch DNA uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; FFPE) biologische monsters, met behulp van silicamembraan-technologie (QIAamp-technologie).

Het is bedoeld voor handmatige monsterbereiding en geeft geen kwalitatieve of kwantitatieve testresultaten.

Prestatiekenmerken

Opmerking: De prestatiekenmerken zijn sterk afhankelijk van verschillende factoren, en houden verband met de specifieke latere toepassing. Ze zijn vastgesteld voor de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit in combinatie met exemplaire FFPE-ingebede weefseltypen en exemplaire vervolgpcedures. Methoden voor het isoleren van nucleïnezuren worden gebruikt in combinatie met een ander biologisch specimen en als een front-end voor meerdere vervolgpcedures. Prestatieparameters zoals kruisbesmetting of herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de run moeten bepaald worden voor dergelijke workflows als onderdeel van de ontwikkeling van latere toepassingen. Daarom is het de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de gehele workflow te valideren om de juiste prestatieparameters vast te stellen.

Basiswerking en compatibiliteit met verschillende latere toepassingen

Downstream-analyse

Het geëluëerde genomische DNA is klaar voor gebruik in verschillende vervolgpcedures, waaronder uiteenlopende diagnostische in-vitro-vervolgpcedures. Raadpleeg de handleiding van de betreffende QIAGEN®-kit voor meer informatie over de specifieke systeempresetaties.

Opbrengst van gezuiverd DNA

In formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded; FFPE) monsters kunnen een hoge mate van weefselheterogeniteit vertonen. Bovendien kan het oppervlaktegebied van weefsel per FFPE-monster sterk verschillen, waardoor de hoeveelheid en kwaliteit van geëxtraheerd DNA kan variëren. Daarom dient de gebruiker het aantal coupes, de coupedikte en het coupeoppervlak voor het monster in kwestie en eventuele procedures voor het verkrijgen van DNA van geschikte hoeveelheid en kwaliteit voor de specifieke vervolgpcedures in hun laboratorium te optimaliseren.

Als de kit wordt gebruikt in combinatie met een kit of ander hulpmiddel van QIAGEN voor verdere verwerking of analyse, raadpleeg dan de instructies in de betreffende handleiding.

Onvoldoende dehydratie tijdens het prepareren van het weefsel door middel van FFPE; te veel paraffine met het weefsel in het extractiebuisje; het gebruik van ethanol met een lagere dan de aanbevolen zuiverheidsgraad (niet voor moleculaire biologie); of de aanwezigheid van achtergebleven xyleen of ethanol in het monster kan leiden tot een suboptimale extractie en een lage hoeveelheid en kwaliteit DNA.

Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid is beoordeeld aan de hand van 6 FFPE-cellijnen ontwikkeld uit menselijke cellen, gefixeerd in formaline en ingebed in paraffine. De monsters zijn getest met QuantiTect® SYBR® Green master mix en specifieke primers voor het β -actine gen, samen met de Rotor-Gene® Q real-time PCR cycler. De PCR-reacties werden uitgevoerd voor een fragment van 174 bp en voor een fragment van 218 bp van het β -actine-gen.

Voor de statistische analyse werden 72 datapunten gebruikt voor iedere fragmentgrootte. Bij de statistische analyse werden ook de standaarddeviatie (Standard Deviation; SD) en de onderste en bovenste 95%-betrouwbaarheidsgrenzen berekend. De variatie werd geschat door gebruik van de analyse van de variantiecomponent als de standaarddeviatie voor het fragment van 218 bp (SD: 0,342 CT; onderste 95%-betrouwbaarheidsgrens: 0,291; bovenste 95%-betrouwbaarheidsgrens: 0,413). Dit kan gebruikt worden als een schatting voor de herhaalbaarheid van het extractieproces. De geschatte variatie voor het fragment van 174 bp was 0,258 CT; onderste 95%-betrouwbaarheidsgrens: 0,220; bovenste 95%-betrouwbaarheidsgrens: 0,312.

Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid tussen drie verschillende laboratoria is bepaald met behulp van drie klinische FFPE-monsters met weefsel van niet-kleincellig longcarcinoom (Non-Small Cell Lung Cancer; NSCLC): één specimen met een deletiemutatie op 6223, één met een L858R-mutatie en één met een wild-type (WT) specimen. De klinische FFPE-monsters waren geselecteerd op basis van hun bekende mutatiestatus, bepaald door middel van Sanger-sequencing.

Voor elk klinisch FFPE-mutatiemonster werden 48 opeenvolgende FFPE-coupes gerandomiseerd in paren om te worden gebruikt voor extractie en deze werden in drie partijen verdeeld, één partij per testlocatie.

Op iedere testlocatie werden de extracties uitgevoerd in duplo. Iedere testlocatie gebruikte voor de extractie één unieke partij van de QIAamp FFPE DNA DSP Kits. Op alle drie de locaties werd de beoordeling van de monsters en van de mutaties uitgevoerd met behulp van de *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit. De monsters werden getest op drie niet-opeenvolgende dagen gedurende een periode van zes dagen. Elk specimen werd 6 keer getest op iedere locatie, waardoor in totaal 18 datapunten per specimen werden verkregen.

Voor alle monsters werden in alle drie de locaties de mutaties 100% correct geïdentificeerd.

Lineariteit

De QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan worden gebruikt voor het isoleren van DNA uit verschillende weefseltypes. Voor de specifieke vereisten van de klant dient een lineair bereik te worden vastgesteld en gevalideerd voor het betreffende gebruik. Voor verschillende weefseltypes is een verschillend lineair bereik te verwachten, afhankelijk van de hoeveelheid gebruikt weefsel in het systeem en de kenmerken van het betreffende weefsel.

Stoffen met een versturende werking

De QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan worden gebruikt voor het isoleren van DNA uit verschillende weefseltypes. Uit verschillende bronnen kunnen stoffen afkomstig zijn die interfererend kunnen werken. Voorbeelden hiervan zijn natuurlijke omzettingsproducten die specifiek zijn voor het weefseltype en het orgaan, omzettingsproducten die geproduceerd worden onder pathologische omstandigheden, stoffen die tijdens de behandeling van de patiënt worden geïntroduceerd, of stoffen die door de patiënt zijn ingeslikt.

Het testen van interfererende stoffen werd uitgevoerd met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit voor monsterbereiding, in combinatie met exemplaire vervolgtoeepassingen voor een beoordeling van de kwaliteit van de geëxtraheerde nucleïnezuren. Voorbeelden voor geteste diagnostische QIAGEN-kits worden vermeld in Tabel 1.

Verschiedende vervolgpcedures kunnen echter verschillende vereisten hebben als het gaat om zuiverheid (d.w.z de afwezigheid van mogelijk interfererende stoffen) en interfererende stoffen die aanwezig zijn in het specifieke monster kunnen divers zijn. Zodoende moet de identificatie, het testen en de controle van relevante interfererende stoffen ook worden bepaald als onderdeel van de specifieke diagnostische workflow met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit en de specifieke vervolgpcedure.

Tabel 1. Onderzoek interfererende stoffen vervolgasay

Diagnostische kit	Geteste interfererende stoffen	Conclusie
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Paraffinewas Xyleen Ethanol Buffer ATL Proteïnase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobine	Vijf mutantmonsters (waarvan elke een van de assays in de PIK3CA-kit vertegenwoordigt) en een WT-monster zijn verrijkt met 9 mogelijk interfererende stoffen en zijn getest op het effect dat ze hebben op gemiddelde ΔC_t - en mutatiresultaten. Uit de gegevens van dit onderzoek blijkt dat de geteste interfererende stoffen geen effect hadden op mutant- of WT-monsters bij de gebruikte concentraties. Wanneer een significant verschil werd waargenomen, viel dit binnen de 3x intermediaire nauwkeurigheid van de assay en viel dit derhalve binnen de inherente variatie van de assay. Alle mutatiresultaten in zowel mutant- als WT-monsters waren zoals verwacht. Uit de gegevens van dit onderzoek blijkt dat het onderzoek voldeed aan de acceptatiecriteria.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Paraffinewas Xyleen Ethanol Buffer ATL Proteïnase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Dit onderzoek is ontwikkeld om de effecten van mogelijk interfererende stoffen op de prestaties van de KRAS-kit te evalueren. Voor mutantmonsters was het doel om te laten zien dat de gemiddelde assaywaarden in monsters met een interfererende stof niet significant verschilden van monsters zonder de interfererende stof. Voor WT-monsters was het doel om te laten zien dat de aanwezigheid van een interfererende stof niet hoeft te leiden tot fout-positieve resultaten. Er waren twee combinaties van assays/interfererende stoffen die leidden tot fout-positieve resultaten. Deze bevonden zich echter in het lage niveau van het xyleen zonder vergelijkbare fout-positieven in de monsters met hoog niveau. Deze twee doelen werden behaald; de hypothese dat geen stof van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit in de concentraties voor normaal gebruik interfereert met de mogelijkheid van de KRAS-kit om onderscheid te kunnen maken tussen mutatie-positieve en mutatie-negatieve monsters.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Paraffinewas Xyleen Ethanol Buffer ATL Proteïnase K Buffer AW1 Buffer AW2	Het doel van dit onderzoek was het verifiëren van het effect van mogelijk interfererende stoffen die worden gebruikt in het extractieproces op de prestatie van de <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) wanneer deze wordt gebruikt op het QIAGEN Rotor-Gene Q MDx platform (RGQ). Voor dit onderzoek werden acht FFPE-standaardmonsters uitgekozen die elk van de 7 EGFR mutatieassays vertegenwoordigen, met daarbij een wild-type (WT). De geschatte verschillen in gemiddelde ΔC_t -waarden voor elke mutant-FFPE-standaard tussen elke twee niveaus interfererende stoffen, en "Lege"-replicaten waren ofwel niet aanzienlijk verschillend van nul of laag met een waarde van minder dan 1 Ct. Alle mutantreplicaten hadden een mutatiresultaat van mutatie gedetecteerd op elk laag en hoog niveau van interfererende stoffen voor alle interfererende stoffen. Alle WT-replicaten hadden een monstermutatiestatus van mutatie niet gedetecteerd op elk laag en hoog niveau van interfererende stoffen voor alle interfererende stoffen. Het onderzoek wees uit dat de reagentia die werden gebruikt in de FFPE-extractiekit de prestaties van de EGFR-kit niet beïnvloedden.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Paraffinewas Xyleen Ethanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Het onderzoek is ontwikkeld om te laten zien dat de aanwezigheid van een mogelijk interfererende stof (van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE-extractiekit)) geen fout-positieve of fout-negatieve resultaten zou produceren voor de NSCLC-kit van het KRAS-systeem; d.w.z. dat het mutatiresultaat zou zijn beïnvloed of dat het zou leiden tot een 'fail-safe' van het systeem door het produceren van een ongeldige monsterstatus. Acht mogelijk interfererende stoffen uit het DNA-extractieproces die zijn geïdentificeerd. Elke stof werd getest op 8 FFPE-cellijnen, die een van de 7 mutaties vertegenwoordigen die door de KRAS-kit NSCLC-kit worden gedetecteerd, en een WT-monster. De mutatiemonsters werden getest op een niveau dat correspondeert met ongeveer 3 keer de detectielimiet (3 x LOD). Het onderzoek wees uit dat de geteste stoffen geen nadelig effect hadden op de prestaties van de assay op niveau 1 van de interfererende stof; het correcte mutatiresultaat werd altijd opgehaald en de aanwezigheid van de interfererende stof had statistisch gezien geen significant effect op het verschil in ΔC_t voor het grootste gedeelte van de geteste monstercondities (58 van 64 condities, op niveau 1). Wat betreft de 6 monsters waarbij wel sprake was van een statistisch significant verschil, was dit geobserveerde verschil van de gemiddelden voor elk monsters binnen de acceptatiecriteria van $\pm 2 \times SD$ van het onderzoek (SD-schatting opgehaald van het onderzoeksrapport omtrent herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid). Het onderzoek wees tevens uit dat de assay grotere hoeveelheden van elke stof tolereerde dan de verwachte carry-over; d.w.z. het correcte mutatiresultaat werd gegeven wanneer de interfererende stof in een 10 keer grotere concentratie dan verwacht aanwezig was.

Raadpleeg de handleidingen van de betreffende QIAGEN-kits voor specifieke vervolgpcedures voor meer informatie over versturende stoffen.

Kruisbesmetting

Om het niveau van kruisbesmetting te beoordelen, werden er twee FFPE-cellijnen van NSCLC-monsters gebruikt: WT- en het FFPE-celijnmonster die de mutatie exon 21 L858R bevatten. In dit onderzoek werd geprobeerd een situatie na te bootsen waarin monsters met een hoog mutatiegehalte via kruiscontaminatie andere monsters in dezelfde extractieprocedure kunnen verontreinigen. De zuivering van DNA werd uitgevoerd en getest door DNA te zuiveren uit monsters van de cellen met de L858R-mutatie die naast WT-monsters waren geplaatst, met één set reagentia. De mate van kruisbesmetting werd bepaald met behulp van de *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Uit de resultaten bleek dat er binnen het gehele systeem geen kruisbesmetting was opgetreden.

Prestatie van DNA in het eluaat van de QIAamp DSP DNA FFPE-kit bij Pyrosequencing® en op qPCR-gebaseerde assays

DNA dat geïsoleerd was uit FFPE-weefsel werd verdund tot een concentratie van 2 ng/µl voor analyse met behulp van het *therascreen* EGFR Pyro-assay. In alle runs ter bepaling van de prestatiekenmerken was het signaal hoger dan 30 relatieve lichteenheden (Relative Light Units; RLU) voor alle codons, en bij alle monsters werd de juiste medische uitkomst gevonden bij de mutatie-analyse.

DNA dat geïsoleerd was uit FFPE-weefsel van patiënten met colorectale kanker, niet-kleincellige longkanker en borstkanker werd rechtstreeks gebruikt in de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, de *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, de KRAS RGQ PCR NSCLC Kit, en de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. De Ct-waarden van het DNA dat werd geëxtraheerd met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit waren binnen de werkbereik-parameters die zijn bepaald voor elke assay en zijn beschreven in de respectievelijke handleidingen.

Stabiliteit van het eluaat

De stabiliteit van het eluaat is afhankelijk van de samenstelling en het soort verontreinigingen die bij de zuivering zijn meegekomen (hangt samen met het weefseltype), het elutievolume en de opslagomstandigheden. Wij raden gebruikers aan de stabiliteit van het eluaat te bepalen volgens hun specifieke vereisten.

Als de kit wordt gebruikt in combinatie met een kit of ander hulpmiddel van QIAGEN voor verdere verwerking of analyse, raadpleeg dan de instructies in de handleiding van de betreffende kit. Een exemplair onderzoek omtrent de stabiliteitsverificatie wees uit dat DNA dat was geëxtraheerd uit FFPE-weefselmonsters geschikt is voor gebruik met de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wanneer dit tot 7 dagen wordt opgeslagen bij 4 °C met extra opslag bij -20 °C voor een totale opslagtijd van vijf weken met meerdere vries-dooicycli.

Symbolen

Dit document bevat de volgende symbolen. Raadpleeg de handleiding voor een volledige lijst met symbolen die worden gebruikt in de gebruiksaanwijzing, op de verpakking of op de labels.

Symbol	Symboldefinitie
	Dit product voldoet aan de vereisten van de Europese regelgeving 2017/746 inzake in-vitrodiagnostische medische hulpmiddelen.
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Catalogusnummer
Rn	'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing; 'n' is het revisienummer
	Fabrikant

Revisiegeschiedenis

Revisie	Beschrijving
R1, juni 2022	<p>Versie 2, revisie 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Update naar versie 2 voor naleving van IVDR• Paragrafen over Interfererende stoffen, Kruisbesmetting, Stabiliteit van het eluaat en Compatibiliteit met latere toepassingen toegevoegd

Raadpleeg de (gebruikers)handleiding van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Handleidingen en gebruiksaanwijzingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, iTherascreen® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Gedeponeerde namen, handelsmerken enz. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet worden beschouwd als niet wettelijk beschermd.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

