Giugno 2022

QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit
Istruzioni per l'uso (caratteristiche delle prestazioni)

Versione 2

IVD

Per uso diagnostico in vitro
Per l'uso con QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

CE

REF 60404

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1

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

Sample to Insight

Introduzione generale

Il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit è un sistema che utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento e la purificazione di DNA genomico da campioni biologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

È destinato alla preparazione dei campioni manuale e non fornisce risultati di test, né qualitativi né quantitativi.

Caratteristiche delle prestazioni

Nota: le caratteristiche delle prestazioni dipendono fortemente da vari fattori e sono legate alla specifica applicazione a valle. Sono state stabilite per il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit in relazione a tipi esemplari di tessuto incorporato in FFPE e ad applicazioni a valle di esempio. Tuttavia, i metodi per l'isolamento degli acidi nucleici sono usati in combinazione con diversi campioni biologici e come front-end di molteplici applicazioni a valle. I parametri di prestazione, come la contaminazione crociata o la ripetibilità e riproducibilità tra sedute, devono essere stabiliti per qualsiasi flusso di lavoro come parte dello sviluppo dell'applicazione a valle. Pertanto, è responsabilità dell'utente convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire i parametri di prestazione appropriati.

Prestazioni di base e compatibilità con diverse applicazioni a valle

Analisi a valle

Il DNA genomico eluito è pronto per essere utilizzato in diversi esami downstream, inclusa una grande varietà di esami downstream di diagnostica in vitro. Per maggiori informazioni riguardo le prestazioni del sistema specifico, fare riferimento al manuale del kit QIAGEN® pertinente.

Resa del DNA purificato

I campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, 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 e della qualità di DNA 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 nel proprio laboratorio per ottenere DNA di quantità e qualità adeguate per le specifiche applicazioni a valle.

Se il kit viene utilizzato unitamente a un'applicazione QIAGEN a valle, fare riferimento al relativo manuale per le istruzioni.

Un'insufficiente disidratazione dei tessuti durante la preparazione dei tessuti FFPE, l'aggiunta di una quantità eccessiva di paraffina con il 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 xilene o etanolo può comportare un'estrazione inferiore a quella ottimale e una bassa quantità e qualità di DNA.

Ripetibilità

La ripetibilità è stata valutata utilizzando 6 linee di cellule FFPE generate da cellule umane fissate in formalina e incluse in paraffina. I campioni sono stati testati con la miscela master QuantiTect® SYBR® Green e primer della β-actina gene-specifici utilizzando il termociclatore per real-time PCR Rotor-Gene® Q. Le reazioni di PCR sono state effettuate per un frammento da 174 bp e per un frammento da 218 bp del gene della β-actina umano.

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati 72 punti dati per ogni dimensione di frammento. L'analisi statistica ha incluso il calcolo della deviazione standard (Standard Deviation, SD) e i limiti superiore e inferiore di confidenza al 95%. La variazione è stata stimata utilizzando l'analisi della componente della varianza come deviazione standard per il frammento da 218 bp (SD: 0,342 CT; limite inferiore di confidenza al 95%: 0,291; limite superiore di confidenza al 95%: 0,413). Questo risultato può essere utilizzato come stima della ripetibilità

per il processo di estrazione. La variazione stimata per il frammento da 174 bp è stata di 0,258 CT; limite inferiore di confidenza al 95%: 0,220; limite superiore di confidenza al 95%: 0,312.

Riproducibilità

La valutazione della riproducibilità è stata effettuata su tre laboratori utilizzando 3 campioni FFPE clinici contenenti tessuto di carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): uno presentava una mutazione 6223 di delezione, uno presentava una mutazione L858R e uno era un wild-type (WT). I campioni FFPE clinici sono stati selezionati sulla base del loro stato di mutazione noto secondo il sequenziamento Sanger.

Per ognuno dei campioni FFPE clinici mutanti, 48 sezioni FFPE sequenziali sono state randomizzate a coppie per essere utilizzate in un'estrazione e divise in tre lotti, uno per ogni sito.

Estrazioni sono state effettuate in duplicato per ogni sito di test. Ogni sito ha utilizzato per l'estrazione un unico lotto di QIAamp FFPE DNA DSP Kit. La valutazione dei campioni e la valutazione delle mutazioni sono state effettuate utilizzando il *therascreen*® EGFR RGQ PCR Kit nei tre siti. I campioni sono stati testati in 3 giorni non consecutivi nell'arco di 6 giorni. Ogni campione è stato testato 6 volte in ognuno dei siti per un totale di 18 punti dati per campione.

Per tutti i campioni, sull'insieme dei tre siti, è stato dimostrato il 100% di classificazioni corrette della mutazione.

Linearità

Il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit può essere utilizzato per l'isolamento del DNA da diversi tipi di tessuti. 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.

Sostanze interferenti

Il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit può essere utilizzato per l'isolamento del DNA da diversi tipi di tessuti. Sostanze potenzialmente interferenti possono provenire da diverse fonti, ad esempio 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.

I test sulle sostanze interferenti sono stati eseguiti utilizzando il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit per la preparazione dei campioni in combinazione con applicazioni a valle di esempio per la valutazione della qualità degli acidi nucleici estratti. Nella Tabella 1 sono elencati esempi di kit diagnostici QIAGEN testati.

Tuttavia, le diverse applicazioni a valle possono avere requisiti diversi per quanto riguarda la purezza (cioè l'assenza di potenziali sostanze interferenti) e gli interferenti presenti nel campione specifico possono essere diversi. Pertanto, l'identificazione, la verifica e il controllo delle sostanze interferenti rilevanti devono essere stabiliti come parte del flusso di lavoro diagnostico specifico che coinvolge il QIAamp DSP FFPE Tissue Kit e l'applicazione specifica a valle.

Tabella 1. Studio delle sostanze interferenti nell'esame downstream

Kit diagnostico	Interferenti testati	Conclusione
therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit	Cera di paraffina Xilene Etanolo Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Emoglobina	Cinque campioni mutanti (ciascuno rappresentante uno degli esami del kit PIK3CA) e un campione WT sono stati addizionati di 9 potenziali sostanze interferenti e analizzati per verificarne l'effetto sul ΔCt medio e sulla classificazione delle mutazioni. I dati di questo studio mostrano che gli interferenti testati non hanno avuto alcun effetto sui campioni mutanti o WT alle concentrazioni utilizzate. Nei casi in cui si osservava una differenza significativa, questa rientrava in una precisione intermedia tripla accettabile dell'esame e, pertanto, nella variabilità a esso inerente. Tutte le classificazioni della mutazione sia in campioni con mutazioni che WT erano conformi alle previsioni. I dati osservati in questo studio dimostrano che lo studio ha soddisfatto i criteri di accettazione.
therascreen KRAS RGQ PCR Kit	Cera di paraffina Xilene Etanolo Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Questo studio è stato concepito per valutare gli effetti di potenziali sostanze interferenti sulle prestazioni del kit KRAS. Per i campioni mutanti, l'obiettivo era dimostrare che i valori medi dell'esame nei campioni con una sostanza interferente non differivano significativamente da quelli senza sostanza interferente. Per i campioni WT, l'obiettivo era dimostrare che la presenza di una sostanza interferente non avrebbe causato risultati falsi positivi. Ci sono state due combinazioni di esame/sostanza interferente che hanno dato luogo a risultati falsi positivi. Tuttavia, si trattava in entrambi i casi di campioni di xilene a basso livello, senza falsi positivi comparabili nei campioni ad alto livello. Entrambi gli obiettivi sono stati raggiunti, confermando l'ipotesi che nessuna sostanza del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit alle concentrazioni di uso normale interferisce con la capacità del kit KRAS di distinguere tra campioni positivi e negativi alle mutazioni.
therascreen EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Cera di paraffina Xilene Etanolo Buffer ATL Proteinase K Buffer AW1 Buffer AW2	L'obiettivo di questo studio era verificare l'effetto di potenziali sostanze interferenti utilizzate nel processo di estrazione sulle prestazioni del *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (kit EGFR) quando utilizzato sulla QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Platform (RGQ). Per questo studio sono stati scelti otto campioni standard FFPE che rappresentano ciascuno dei 7 esami di mutazione EGFR più un wild type (WT). Le differenze stimate nei valori medi del ΔCt per ciascuno degli standard FFPE mutanti tra ciascuno dei due livelli di interferenti e i replicati "Blank" sono state non significativamente diverse da zero o considerate piccole con un valore inferiore a 1Ct. Tutti i replicati mutanti hanno presentato una classificazione delle mutazioni rilevata a ciascuno dei livelli di interferente bassi e alti per tutti gli interferenti. Tutti i replicati WT hanno presentato uno stato di mutazione del campione non rilevata a ciascuno dei livelli di interferente bassi e alti per tutti gli interferenti. Lo studio ha confermato che i reagenti utilizzati nel kit di estrazione FFPE non influiscono sulle prestazioni del kit EGFR.
therascreen KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Cera di paraffina Xilene Etanolo Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Lo studio è stato concepito per dimostrare che la presenza di una potenziale sostanza interferente (proveniente dal QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (kit di estrazione FFPE)) non avrebbe prodotto risultati falsi positivi o falsi negativi per il kit KRAS System NSCLC; in altre parole, la classificazione delle mutazioni sarebbe stata influenzata o avrebbe causato il "fail-safe" del sistema producendo uno stato di campione non valido. Sono state identificate otto sostanze potenzialmente interferenti dal processo di estrazione del DNA. Ogni sostanza è stata testata su 8 linee cellulari FFPE, che rappresentano ciascuna delle 7 mutazioni rilevate dal kit KRAS kit NSCLC, e su un campione WT. I campioni di mutazione sono stati analizzati a un livello corrispondente a circa 3 volte il limite di sensibilità (3 x LOD). Lo studio ha dimostrato che le sostanze testate non hanno avuto alcun effetto negativo sulle prestazioni dell'esame al livello di interferente 1x; la classificazione delle mutazioni corretta è sempre stata effettuata e la presenza della sostanza interferente non ha avuto un effetto statisticamente significativo sulla differenza di ΔCt nella maggior parte delle condizioni di campione testate (58 condizioni su 64, al livello 1x). Per i 6 campioni che hanno mostrato una differenza statisticamente significativa, la differenza osservata nelle medie di ciascun campione rientrava nel criterio di accettazione dello studio di ±2 x SD (stima SD tratta dal rapporto dello studio di ripetibilità e riproducibilità). Lo studio ha inoltre dimostrato che l'esame è tollerante a livelli di ciascuna sostanza più elevati rispetto al carry-over previsto, cioè la classificazione delle mutazioni corretta è stata fornita quando la sostanza interferente era presente a una concentrazione 10 volte superiore a quella prevista.

Per maggiori informazioni riguardo le sostanze interferenti in specifiche applicazioni QIAGEN a valle, fare riferimento ai manuali dei kit.

Contaminazione crociata

Per valutare il livello di contaminazione crociata, sono stati utilizzati due campioni NSCLC di linee cellulari FFPE: WT e il campione di linee cellulari FFPE che presentava la mutazione L858R dell'esone 21. Lo studio aveva lo scopo di simulare la situazione in cui campioni contenenti un elevato livello di mutazioni possono provocare la contaminazione crociata di altri campioni nel corso della procedura di estrazione. È stata effettuata la purificazione del DNA per testare la procedura purificando il DNA di campioni L858R mutanti collocati accanto a campioni WT, utilizzando un unico lotto di reagenti. La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando il *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. I risultati non hanno mostrato alcuna contaminazione crociata nell'intero sistema.

Prestazioni dell'eluato di QIAamp DSP DNA FFPE DNA in Pyrosequencing® ed esami basati su qPCR

Il DNA isolato da tessuto FFPE è stato diluito fino a una concentrazione di DNA di 2 ng/µl per essere testato con l'esame *therascreen* EGFR Pyro. In tutte le ripetizioni utilizzate per la determinazione delle caratteristiche delle prestazioni, il segnale era superiore a 30 RLU (unità di luce relative) per tutti i codoni e tutti i campioni hanno dato un risultato medico corretto per l'analisi delle mutazioni.

Il DNA isolato da tessuto FFPE di pazienti con cancro colorettale, cancro polmonare non a piccole cellule e cancro al seno è stato utilizzato direttamente nel *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, nel *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, nel KRAS RGQ PCR NSCLC Kit e nel *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. I valori Ct del DNA estratto con il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit rientravano nei parametri dell'intervallo di lavoro definiti per ciascun esame e descritti nei rispettivi manuali.

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 secondo i propri requisiti particolari.

Se il kit viene utilizzato unitamente a un'applicazione QIAGEN a valle, fare riferimento al relativo manuale per le istruzioni. Uno studio esemplare di verifica della stabilità ha dimostrato che il DNA estratto da campioni di tessuto FFPE è adatto all'uso con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se conservato per un massimo di 7 giorni a 4°C con ulteriore conservazione a -20°C per un totale di cinque settimane con cicli multipli di congelamento/scongelamento.

Simboli

Nel presente documento compaiono i seguenti simboli. Per un elenco completo dei simboli utilizzati nelle istruzioni per l'uso o sulla confezione e sull'etichettatura, consultare il manuale.

Simbolo	Definizione del simbolo
CE	Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.
IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
REF	Numero di catalogo
Rn	R sta per revisione delle istruzioni per l'uso e n è il numero di revisione
	Produttore

Cronologia delle revisioni

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	Versione 2, revisione 1 • Aggiornamento alla versione 2 per la conformità a IVDR • Sono state aggiunte sezioni per sostanze interferenti, contaminazione crociata, stabilità degli eluiti e compatibilità con le applicazioni a valle

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®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); SYBR® (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-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.