



Czerwiec 2022 r.

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

Instrukcja użycia (Parametry skuteczności)

Wersja 2



Do diagnostyki in vitro

Do użytku z zestawem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Niemcy

R1

Dokument Parametry skuteczności jest dostępny w wersji elektronicznej na karcie z materiałami źródłowymi na stronie produktu pod adresem www.qiagen.com.

Wprowadzenie ogólne

Zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit to system, który wykorzystuje technologię membrany krzemionkowej (technologia QIAamp) do izolacji i oczyszczania genomowego DNA z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) próbek biologicznych.

Jest on przeznaczony do ręcznego przygotowania próbki i nie generuje wyników testu (jakościowych ani ilościowych).

Parametry skuteczności

Uwaga: Parametry skuteczności w znacznym stopniu zależą od różnych czynników i są powiązane z określonymi dalszymi etapami procedury. Dla zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit zostały one ustalone w połączeniu z przykładowymi typami tkanek FFPE i przykładowymi dalszymi zastosowaniami. Jednak przed dalszymi etapami procedur wykorzystywane są różne metody izolacji kwasów nukleinowych w połączeniu z różnymi materiałami biologicznymi. W ramach opracowywania dalszych etapów procedur należy określić parametry skuteczności, np. dotyczące zanieczyszczenia krzyżowego lub powtarzalności i odtwarzalności testu. Dlatego obowiązkiem użytkownika jest walidacja całej procedury w celu uzyskania odpowiednich parametrów skuteczności.

Podstawowa skuteczność i zgodność z różnymi dalszymi zastosowaniami

Dalsze analizy

Eluowany genomowy DNA jest gotowy do użytku w różnych dalszych oznaczeniach, w tym różnorodnych dalszych oznaczeniach diagnostycznych *in vitro*. Więcej informacji na temat działania systemu zawiera odpowiednia instrukcja obsługi zestawu firmy QIAGEN®.

Uzysk oczyszczonego DNA

Utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) próbki mogą charakteryzować się wysoką heterogenicznością tkanki. Ponadto obszar powierzchni próbek FFPE jest wysoce zróżnicowany, przez co ilość i jakość wyizolowanego DNA może się różnić. Dlatego użytkownik powinien zoptymalizować procedury stosowane w laboratorium oraz liczbę, grubość i obszar powierzchni skrawków pod kątem przetwarzanej próbki, aby uzyskać DNA w ilości i jakości odpowiedniej dla wybranych dalszych procedur.

Jeśli zestaw ten jest używany w połączeniu z wykonywaną na dalszym etapie procedurą opracowaną przez firmę QIAGEN, należy zapoznać się z odpowiednią instrukcją obsługi, aby uzyskać wskazówki.

Niewystarczające odwodnienie tkanki podczas przygotowania próbek FFPE, umieszczenie zbyt dużej ilości parafiny w próbówce do izolacji z próbką, zastosowanie etanolu o czystości mniejszej niż zalecana (o klasie czystości nieodpowiedniej dla biologii molekularnej) lub pozostałości ksyleny bądź etanolu w próbce mogą powodować nieoptymalną izolację i małą ilość oraz niską jakość DNA.

Powtarzalność

Powtarzalność oceniono, wykorzystując 6 próbek FFPE z linii komórkowych otrzymanych z ludzkich komórek, utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Próbki przetestowano przy użyciu mieszaniny Master Mix QuantiTect® SYBR® Green oraz starterów swoistych dla genu β -aktyny wraz z aparatem do reakcji real-time PCR Rotor-Gene® Q. Reakcje PCR zostały przeprowadzone dla fragmentu o długości 174 pz i fragmentu o długości 218 pz ludzkiego genu β -aktyny.

W analizie statystycznej wykorzystano po 72 punkty danych uzyskane na podstawie poszczególnych fragmentów. Analiza statystyczna obejmowała obliczenie odchylenia standardowego (Standard Deviation, SD) oraz górnej i dolnej granicy 95-procentowego przedziału ufności. Zmienność została oceniona na podstawie analizy zmiennych elementów badania poprzez obliczenie odchylenia standardowego dla fragmentu o długości 218 pz (SD: 0,342 CT; dolna granica 95-procentowego przedziału ufności: 0,291; górna granica 95-procentowego przedziału ufności: 0,413). Na podstawie tej wartości można oszacować powtarzalność procesu izolacji. Zmienność w przypadku fragmentu o długości 174 pz wyniosła 0,258 CT; dolna granica 95-procentowego przedziału ufności: 0,220; górna granica 95-procentowego przedziału ufności: 0,312.

Odtwarzalność

Ocena odtwarzalności została przeprowadzona w trzech laboratoriach z wykorzystaniem 3 klinicznych próbek FFPE zawierających tkankę niedrobnokomórkowego raka płuca (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): jedna próbka z delecją (mutacja 6223), jedna z mutacją L858R i jedna próbka typu dzikiego (Wild-Type, WT). Kliniczne próbki FFPE wybrano na podstawie znanego statusu mutacji określonego metodą sekwencjonowania Sangera.

48 następujących po sobie skrawków poszczególnych próbek klinicznych FFPE z mutacjami poddano randomizacji, dzieląc je na pary do wykorzystania w procesie izolacji, i podzielono je na trzy partie — po jednej na ośrodek badawczy.

W każdym ośrodku badawczym izolację przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Do izolacji w każdym ośrodku wykorzystano unikatową serię zestawów QIAamp FFPE DNA DSP Kit. Oceny próbek i mutacji dokonano, wykorzystując zestaw *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit we wszystkich trzech ośrodkach. Próbkę testowano przez 3 nienastępujące po sobie dni na przestrzeni 6 dni. Każdą próbkę przetestowano 6-krotnie w każdym ośrodku, co pozwoliło na uzyskanie łącznie 18 punktów danych na próbkę.

Dla wszystkich próbek we wszystkich trzech ośrodkach uzyskano prawidłowe rozpoznania mutacji na poziomie 100%.

Liniowość

Zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit służy do izolacji DNA z tkanek różnego typu. Zakres liniowy powinien zostać ustalony zgodnie z wymaganiami klienta i zwalidowany pod kątem określonego zastosowania. Dla różnych typów tkanek oczekiwane są różne zakresy liniowe, które zależą od ilości tkanki w systemie oraz jej właściwości.

Substancje zakłócające

Zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit służy do izolacji DNA z tkanek różnego typu. Substancje potencjalnie zakłócające mogą pochodzić z różnych źródeł, np. mogą być to naturalne metabolity swoiste dla typu tkanki i narządu, metabolity wytwarzane w stanach patologicznych, substancje wprowadzone do ciała pacjenta podczas leczenia lub substancje spożyte przez pacjenta.

Badanie pod kątem substancji zakłócających zostało przeprowadzone przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit przeznaczonego do przygotowania próbki w połączeniu z przykładowymi dalszymi procedurami służącymi do oceny jakości wyizolowanych kwasów nukleinowych. Przykłady przetestowanych zestawów diagnostycznych firmy QIAGEN zawiera Tabela 1.

Jednak wymagania w zakresie czystości (braku potencjalnych substancji zakłócających) mogą różnić się zależnie od dalszych zastosowań. Ponadto w określonej próbce występować mogą różne substancje zakłócające. Dlatego w ramach stosowanej procedury diagnostycznej obejmującej wykorzystanie zestawu QIAamp DSP FFPE Tissue Kit i określonych dalszych procedur należy także opracować proces identyfikacji, badania i kontrolowania odpowiednich substancji zakłócających.

Tabela 1. Badanie pod kątem substancji zakłócających w dalszej analizie

Zestaw diagnostyczny	Przetestowane substancje zakłócające	Wniosek
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Parafina Ksylen Etanol Buffer ATL Proteinaza K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobina	Do pięciu próbek z mutacjami (każda odpowiadająca jednemu z oznaczeń w zestawie PIK3CA) i jednej próbki WT dodano 9 potencjalnych substancji zakłócających, a następnie przetestowano ich wpływ na średnią wartość ΔCt oraz rozpoznanie mutacji. Dane uzyskane w tym badaniu wykazały, że przetestowane substancje zakłócające w zastosowanym stężeniu nie miały wpływu na próbki z mutacjami ani WT. W przypadkach, gdy zaobserwowano istotną różnicę, mieściła się ona w granicach 3-krotności precyzji pośredniej oznaczenia, a tym samym w granicach nieodłącznej zmienności oznaczenia. Wszystkie rozpoznania mutacji w próbkach zawierających mutacje oraz próbkach WT były zgodne z oczekiwaniami. Dane uzyskane w tym badaniu wykazały, że badanie spełnia kryteria akceptacji.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Parafina Ksylen Etanol Buffer ATL Proteinaza K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	To badanie zaprojektowano w celu oceny wpływu substancji potencjalnie zakłócających na działanie zestawu KRAS. W przypadku próbek zawierających mutacje celem było wykazanie, że średnie wartości oznaczenia w próbkach z substancją zakłócającą nie różnią się znacząco od wartości uzyskanych dla próbek bez takich substancji. W przypadku próbek WT celem było wykazanie, że obecność substancji zakłócającej nie spowoduje uzyskania wyników fałszywie pozytywnych. W dwóch kombinacjach oznaczenie/substancja zakłócająca uzyskano wyniki fałszywie pozytywne. Oba przypadki dotyczyły jednak niskiego poziomu stężenia ksylenu. Nie uzyskano podobnych wyników fałszywie pozytywnych w przypadku próbek o wyższym stężeniu. Oba cele zostały spełnione, co potwierdza hipotezę zakładającą, że żadna substancja pochodząca z zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit w stężeniu stosowanym w standardowych procedurach nie zakłóca zdolności do różnicowania próbek pozytywnych i negatywnych względem mutacji przez zestaw KRAS.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Parafina Ksylen Etanol Buffer ATL Proteinaza K Buffer AW1 Buffer AW2	Celem tego badania była ocena wpływu substancji potencjalnie zakłócających, stosowanych w procesie izolacji, na działanie zestawu <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (zestaw EGFR) w połączeniu z aparatem QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Platform (RGQ). Do tego badania wybrano osiem wzorców próbek FFPE odpowiadających poszczególnym 7 oznaczeniom mutacji EGFR oraz jednej próbce typu dzikiego (Wild-Type, WT). Szacowane różnice w średnich wartościach ΔCt dla każdego wzorca FFPE zawierającego mutację między dwoma poziomami stężenia substancji zakłócających oraz powtórzeń „próby ślepej” nie różniły się znacząco od zera lub zostały uznane za niewielkie (wartość mniejsza od 1Ct). Mutacje zostały wykryte we wszystkich powtórzeniach zawierających mutacje, zarówno przy niskich, jak i wysokich poziomach poszczególnych substancji zakłócających. Wszystkie powtórzenia WT otrzymały status mutacji „niewykryta” zarówno przy niskich, jak i wysokich poziomach poszczególnych substancji zakłócających. Badanie potwierdziło, że odczynniki używane w zestawie FFPE Extraction Kit nie wpływają na działanie zestawu EGFR.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Parafina Ksylen Etanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Badanie zostało zaprojektowane w celu wykazania, że obecność substancji potencjalnie zakłócającej (pochodzącej z zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE Extraction Kit)) nie spowoduje uzyskania wyników fałszywie pozytywnych ani fałszywie negatywnych w przypadku korzystania z zestawu KRAS System NSCLC. Innymi słowy rozpoznanie mutacji przebiegnie prawidłowo, a system nie zgłosi nieważnego statusu próbki z powodu niepewności. W procesie izolacji DNA zidentyfikowano osiem substancji potencjalnie zakłócających. Każdą substancję przetestowano na 8 próbkach FFPE z linii komórkowych, odpowiadających 7 mutacjom wykrywanym przez zestaw KRAS Kit NSCLC Kit i próbce WT. próbki z mutacjami zostały przetestowane przy poziomie stężenia odpowiadającego około 3-krotności granicy wykrywalności (3 x LOD). Badanie wykazało, że przetestowane substancje nie miały negatywnego wpływu na działanie oznaczenia przy stężeniu substancji zakłócającej na poziomie 1x; za każdym razem mutacja została prawidłowo rozpoznana, a obecność substancji zakłócającej nie miała istotnego statystycznie wpływu na różnice w wartości ΔCt w przypadku większości przetestowanych próbek (58 z 64 próbek, stężenie 1x). W przypadku 6 próbek, dla których różnice były statystycznie istotne, zaobserwowana różnica w średnich wartościach poszczególnych próbek mieściła się w kryteriach akceptacji badania wynoszących $\pm 2 \times SD$ (szacowana wartość SD pochodziła z raportu badania powtarzalności i odtwarzalności). Badanie wykazało także tolerancję oznaczenia na poziomy stężenia poszczególnych substancji zakłócających wyższe niż oczekiwane na skutek zanieczyszczenia spowodowanego przeniesieniem, tj. mutacja została prawidłowo rozpoznana w przypadku wystąpienia substancji zakłócającej w stężeniu 10-krotnie wyższym od najwyższego oczekiwanego stężenia.

Więcej informacji na temat wpływu substancji zakłócających na określone dalsze etapy procedur opracowanych przez firmę QIAGEN znajduje się w instrukcjach obsługi zestawów.

Zanieczyszczenie krzyżowe

Do oceny poziomu zanieczyszczenia krzyżowego wykorzystano dwie próbki FFPE NSCLC z linii komórkowych: próbkę WT i próbkę FFPE z linii komórkowych z mutacją L858R w eksonie 21. Celem badania było odwzorowanie sytuacji, w której podczas procedury izolacji próbki zawierające wysoki poziom mutacji mogą zanieczyścić krzyżowo inne próbki. W celu sprawdzenia procedury przeprowadzono oczyszczanie DNA z próbek zawierających mutację L858R, znajdujących się obok próbek WT, wykorzystując jedną serię odczynników. Zanieczyszczenie krzyżowe oceniono za pomocą zestawu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Wyniki wykazały, że w całym systemie nie doszło do zanieczyszczenia krzyżowego.

Wydajność eluatów zawierających DNA uzyskanych przy użyciu zestawów QIAamp DSP DNA FFPE w oznaczeniach Pyrosequencing® i opartych na reakcji qPCR

DNA wyizolowane z tkanki FFPE rozcieńczono do stężenia 2 ng/μl w celu przeanalizowania go przy użyciu oznaczenia *therascreen* EGFR Pyro Assay. We wszystkich testach mających na celu określenie parametrów skuteczności uzyskano sygnał o wartości ponad 30 RLU (względnych jednostek światła) dla wszystkich kodonów, a wynik wszystkich próbek był prawidłowy pod kątem analizy mutacji.

DNA wyizolowane z tkanek FFPE pochodzących od pacjentów z rakiem jelita grubego, niedrobnokomórkowym rakiem płuca i rakiem gruczołu sutkowego zostało użyte bezpośrednio w zestawie *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Wartości Ct DNA wyizolowanego przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit mieściły się w parametrach zakresu roboczego zdefiniowanych dla każdego oznaczenia, wyszczególnionych w poszczególnych instrukcjach obsługi.





Stabilność eluatu

Stabilność eluatu będzie zależeć od zawartości oraz typu oczyszczonych jednocześnie zanieczyszczeń (zależnych od typu tkanki), objętości elucji oraz warunków przechowywania. Zalecamy określenie stabilności eluatów odpowiednio do szczególnych wymogów użytkowników.

Jeśli zestaw ten jest używany w połączeniu z wykonywaną na dalszym etapie procedurą opracowaną przez firmę QIAGEN, należy zapoznać się z odpowiednią instrukcją obsługi, aby uzyskać wskazówki. Przykładowe badanie stabilności wykazało, że DNA wyizolowanego z próbek tkanki FFPE można używać z zestawem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, jeśli jest ono przechowywane do 7 dni w temperaturze 4°C. Dodatkowe przechowywanie możliwe jest w temperaturze -20°C łącznie maksymalnie przez pięć tygodni z wieloma cyklami zamrażania-rozmrażania.

Symbole

W niniejszym dokumencie pojawiają się poniższe symbole. Pełna lista symboli stosowanych w instrukcji użycia lub na opakowaniu i oznaczeniach znajduje się w instrukcji obsługi.

Symbol	Definicja symbolu
	Ten produkt spełnia wymogi Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
Rn	R oznacza wydanie instrukcji użycia, a n oznacza numer wydania
	Producent

Historia zmian

Wydanie

R1, czerwiec 2022 r.

Opis

Wersja 2, wydanie 1

- Aktualizacja do wersji 2 w celu spełnienia wymagań w zakresie IVDR
- Dodano sekcje dotyczące substancji zakłócających, zanieczyszczenia krzyżowego, stabilności eluatów i zgodności z dalszymi zastosowaniami

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu firmy QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały wyraźnie oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

