



Junho de 2022

# Instruções de uso (Características de desempenho) do QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue Kit

Versão 2

**IVD**

Para uso em diagnóstico in vitro  
Para uso com o QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

**CE**

**REF**

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha

R1

As características de desempenho estão disponíveis eletronicamente e podem ser encontradas na guia de recursos da página de produto em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Introdução geral

O QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit é um sistema que usa tecnologia de membrana de sílica (Tecnologia QIAamp) para isolamento e purificação de DNA genômico a partir de amostras biológicas fixadas em formalina e incluídas em parafina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE).

Ele se destina para fins de preparo manual de amostras e não fornece resultados de teste, sejam qualitativos ou quantitativos.

# Características de desempenho

Nota: As características de desempenho dependem muito de vários fatores e estão relacionadas à aplicação a jusante específica. Elas foram estabelecidas para o QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit com tipos de tecido conservados em FFPE e aplicações a jusante exemplares. Contudo, os métodos para isolar ácidos nucleicos são usados com diferentes espécimes biológicas e como um front-end para diversas aplicações a jusante. Os parâmetros de desempenho, tais como contaminação cruzada ou repetibilidade e reprodutibilidade de execução, devem ser estabelecidos para qualquer fluxo de trabalho como parte do desenvolvimento da aplicação a jusante. Portanto, o usuário é responsável por validar todo o fluxo de trabalho de modo a estabelecer os parâmetros de desempenho adequados.

## Desempenho básico e compatibilidade para diferentes aplicações a jusante

### Análise a jusante

O DNA genômico eluído está pronto para ser usado em diferentes ensaios posteriores, incluindo uma variedade de ensaios posteriores de diagnóstico *in vitro*. Consulte o manual do kit QIAGEN® relevante para obter mais informações sobre o desempenho do sistema específico.

### Rendimento de DNA purificado

As amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) podem apresentar um alto grau de heterogeneidade dos tecidos. Além disso, a área de superfície dos tecidos é altamente variável em amostras FFPE, fazendo variar a quantidade e qualidade de DNA extraído. Portanto, o usuário deve otimizar o número de seções, a espessura das seções e a área de superfície das seções em função da sua amostra de interesse e de quaisquer procedimentos usados em seu laboratório para obter quantidade e qualidade adequadas de DNA para as aplicações a jusante específicas.

Se o kit estiver sendo usado em conjunto com uma aplicação QIAGEN a jusante, consulte o manual relevante para obter instruções.

Uma desidratação insuficiente dos tecidos durante a preparação de tecido FFPE, colocar demasiada parafina com a amostra no tubo de extração, usar etanol com menor pureza (de qualidade inadequada para biologia molecular) do que a recomendada ou reter xileno ou etanol na amostra pode reduzir a qualidade da extração e a quantidade e qualidade do DNA.

### Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada com seis linhagens celulares FFPE geradas de células humanas fixadas em formalina e incluídas em parafina. As amostras foram testadas com mistura principal QuantiTect® SYBR® Green e primers específicos ao gene  $\beta$ -actina, juntamente com o termociclador de real-time PCR Rotor-Gene® Q. Foram efetuadas reações de PCR para um fragmento de 174 bp e para um fragmento de 218 bp do gene  $\beta$ -actina humano.

Para a análise estatística, foram usados 72 pontos de dados para cada tamanho de fragmento. A análise estatística incluiu o cálculo do desvio padrão (Standard Deviation, SD) e dos limites de confiança de 95% superior e inferior. A variação foi estimada usando a análise dos componentes de variação como desvio padrão para o fragmento de 218 bp (SD: 0,342 CT; limite de confiança de 95% inferior: 0,291; limite de confiança de 95% superior: 0,413). Isso pode ser usado como uma estimativa de repetibilidade para o processo de extração. A variação estimada para o fragmento de 174 bp foi 0,258 CT; limite de confiança de 95% inferior: 0,220; limite de confiança de 95% superior: 0,312.

## Reprodutibilidade

A avaliação da reprodutibilidade foi realizada em três laboratórios utilizando três amostras FFPE clínicas contendo tecido de câncer de pulmão de células não pequenas (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): uma contendo uma mutação de deleção 6223, uma contendo uma mutação L858R e uma manifestando uma amostra do tipo selvagem (Wild-Type, WT). As amostras FFPE clínicas foram selecionadas com base no seu status de mutação conhecido de acordo com o sequenciamento de Sanger.

Para cada uma das amostras FFPE clínicas mutantes, 48 seções FFPE sequenciais foram emparelhadas de forma randomizada para serem usadas em uma extração e divididas em três lotes, um lote por local de teste.

As extrações foram realizadas em duplicado em cada local de teste. Cada local utilizou um único lote de QIAamp FFPE DNA DSP Kit para a extração. A avaliação de amostras e a avaliação de mutações foram realizadas com o *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit nos três locais. As amostras foram testadas em três dias não consecutivos durante um período de seis dias. Cada amostra foi testada seis vezes em cada local, totalizando 18 pontos de dados por amostra.

Foram demonstradas determinações de mutação 100% corretas para todas as amostras nos três locais.

## Linearidade

O QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit pode ser utilizado para isolar DNA de diferentes tipos de tecido. Deve ser estabelecido um intervalo linear em função dos requisitos do cliente, o qual deve também ser validado em função do seu uso específico. São expectáveis intervalos lineares diferentes para tipos de tecido diferentes, dependendo da carga de tecido no sistema e das características do tecido.

## Substâncias interferentes

O QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit pode ser utilizado para isolar DNA de diferentes tipos de tecido. Podem surgir substâncias potencialmente interferentes de diferentes origens, por exemplo, metabólitos naturais específicos do tipo de tecido e de órgão, metabólitos produzidos durante condições patológicas, substâncias introduzidas durante o tratamento do paciente ou substâncias ingeridas pelo paciente.

Foram realizados testes de substâncias interferentes usando o QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit para o preparo de amostras com aplicações a jusante exemplares para uma avaliação da qualidade dos ácidos nucleicos extraídos. Os exemplos de kits QIAGEN de diagnóstico testados estão listados na Tabela 1.

Entretanto, as diferentes aplicações a jusante podem ter requisitos diferentes em relação à pureza (por ex., a ausência de substâncias potencialmente interferentes) e os interferentes presentes na amostra específica podem variar. Assim, a identificação, os testes e o controle de substâncias interferentes relevantes também precisam ser estabelecidos como parte do fluxo de diagnóstico específico que envolve o QIAamp DSP FFPE Tissue Kit e a aplicação a jusante específica.

Tabela 1. Estudo de substâncias interferentes de ensaio posterior

Kit de diagnóstico	Interferentes testados	Conclusão
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Cera de parafina Xileno Etanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobina	Cinco amostras mutantes (cada uma representando um dos ensaios no PIK3CA Kit) e uma amostra WT foram fortificadas com nove substâncias potencialmente interferentes e testadas quanto ao seu efeito na média $\Delta Ct$ e determinação de mutação.  Os dados deste estudo apontam que os interferentes testados não tiveram efeito sobre as amostras WT ou mutantes nas concentrações usadas. Quando observou-se uma diferença significativa, isso estava em uma precisão intermediária de 3x do ensaio e, portanto, dentro da variabilidade inerente do ensaio.  Todas as determinações de mutação em amostras mutantes e WT ocorreram conforme o esperado. Os dados observados neste estudo apontam que ele atendeu ao critério de aceitação.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Cera de parafina Xileno Etanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Este estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos das substâncias potencialmente interferentes no desempenho do kit KRAS.  Quanto às amostras mutantes, o objetivo foi demonstrar que os valores médios do ensaio nas amostras com uma substância interferente não diferiram significativamente daqueles sem substância interferente. Quanto às amostras WT, o objetivo foi demonstrar que a presença de uma substância interferente não deveria gerar resultados falso-positivos.  Houve duas combinações de substância interferente/de ensaio que geraram resultados falso-positivos. Entretanto, ambas estavam em baixo nível de xileno sem falso-positivos comparáveis nas amostras de alto nível.  Tais objetivos foram alcançados, confirmando a hipótese de que nenhuma substância do QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, nas concentrações em utilização normal, interfere na capacidade do kit KRAS de distinguir entre amostras de mutação positiva e mutação negativa.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Cera de parafina Xileno Etanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AW1 Buffer AW2	Este estudo teve como objetivo verificar o efeito de substâncias potencialmente interferentes utilizadas no processo de extração no desempenho do <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (kit EGFR) quando usado na QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Platform (RGQ).  Oito amostras padrão FFPE, representando cada um dos sete ensaios de mutação EGFR mais um tipo selvagem (Wild-Type, WT), foram escolhidas para este estudo.  As diferenças estimadas nos valores médios de $\Delta Ct$ para cada um dos padrões FFPE mutantes entre cada um dos dois níveis de interferentes e as réplicas "em branco" foram não significativamente diferentes de zero ou consideradas pequenas com um valor inferior a 1Ct.  Todas as réplicas mutantes tiveram uma determinação de mutação da mutação detectada em cada um dos níveis de interferentes altos e baixos para todos os interferentes. Todas as réplicas WT tiveram um status de mutação de amostra da mutação não detectada em cada um dos níveis de interferentes altos e baixos para todos os interferentes.  O estudo confirmou que os reagentes usados no kit de extração FFPE não prejudicam o desempenho do kit EGFR.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Cera de parafina Xileno Etanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	O estudo foi desenvolvido para demonstrar que a presença de uma substância potencialmente interferente (do QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit [kit de extração FFPE]) não produziria nenhum resultado falso-positivo ou falso-negativo para o kit CPCNP do sistema KRAS; em outras palavras, a determinação de mutação seria prejudicada ou faria com que o sistema "falhasse na segurança" ao produzir um status de amostra inválido.  Foram identificadas oito substâncias potencialmente interferentes a partir do processo de extração de DNA. Cada substância foi testada com oito linhas celulares FFPE, representando cada uma das sete mutações detectadas pelo KRAS Kit NSCLC Kit, e uma amostra WT. As amostras de mutação foram testadas a um nível que corresponde a aproximadamente três vezes o limite de detecção (3x LOD).  O estudo demonstrou que as substâncias testadas não apresentaram nenhum efeito adverso no desempenho do ensaio a um nível de 1x de interferente; a determinação da mutação correta sempre foi determinada e a presença da substância interferente não apresentou um efeito estatisticamente significativo na diferença em $\Delta Ct$ na maioria das condições de amostras testadas (58 de 64 condições, a nível de 1x). Quanto às seis amostras que não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa, a diferença observada nas médias de cada amostra esteve dentro do critério de aceitação de estudo de $\pm 2x$ de desvio padrão (Standard Deviation, SD) (estimativa SD retirada do relatório de estudo de repetibilidade e reprodutibilidade).  O estudo também demonstrou que o ensaio tolerou níveis mais altos de cada uma das substâncias do que o carryover esperado, por ex., a determinação de mutação correta ocorreu quando a substância interferente esteve presente em uma concentração 10x mais alta do que a esperada.

Consulte os manuais dos kits para obter mais informações sobre substâncias interferentes em aplicações específicas QIAGEN a jusante.

### Contaminação cruzada

Para avaliar o nível de contaminação cruzada, duas amostras de CPCNP de linhas celulares FFPE foram usadas: WT e a amostra de linha celular FFPE manifestando a mutação L858R do éxon 21. O estudo teve como objetivo reproduzir a situação na qual pode ocorrer contaminação cruzada entre amostras contendo um elevado nível de mutação e outras amostras durante o processo de extração. Para colocar o procedimento à prova, foi realizada a purificação de DNA de amostras com mutação L858R posicionadas junto de amostras WT utilizando um lote de reagentes. A contaminação cruzada foi avaliada com o *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Os resultados demonstraram a inexistência de contaminação cruzada em todo o sistema.

### Desempenho do eluato de DNA no QIAamp DSP DNA FFPE em Pyrosequencing® e ensaios com base em qPCR

Foi diluído DNA isolado de tecido FFPE para uma concentração de DNA de 2 ng/μl para análise com o *therascreen* EGFR Pyro Assay. Em todas as execuções utilizadas para determinar características de desempenho, o sinal esteve acima de 30 URL (Unidade relativa de luz) em todos os códons e todas as amostras apresentaram um efeito métrico correto no que respeita à análise de mutação.

O DNA isolado do tecido FFPE de pacientes com câncer colorretal, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de pulmão foi usado diretamente no *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit e no *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Os valores de Ct do DNA extraído usando o QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit estavam dentro dos parâmetros de intervalo atuantes e definidos para cada ensaio, bem como detalhados nos respectivos manuais.





### Estabilidade do eluato

A estabilidade do eluato dependerá do conteúdo e do tipo de impurezas copurificadas (relacionadas ao tipo de tecido), volume de eluição e condições de armazenamento. Recomendamos que os usuários estabeleçam a estabilidade do eluato em função dos seus requisitos específicos.

Se o kit estiver sendo usado em conjunto com uma aplicação QIAGEN a jusante, consulte o manual do kit relevante para obter instruções. Um estudo exemplar de verificação de estabilidade demonstrou que o DNA extraído de amostras de tecido FFPE é adequado para uso com o *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit quando armazenado por até sete dias a 4 °C, com armazenamento adicional a -20 °C por um total combinado de até cinco semanas com vários ciclos de congelamento/descongelamento.

## Símbolos

Os seguintes símbolos aparecem neste documento. Para obter uma lista completa dos símbolos usados nestas instruções de uso ou na embalagem e etiqueta, consulte o manual.

Símbolo	Definição do símbolo
	Este produto atende aos requisitos do Regulamento Europeu 2017/746 para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de referência
Rn	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão
	Fabricante

## Histórico de revisões

Revisão	Descrição
R1, junho de 2022	Versão 2, Revisão 1 <ul style="list-style-type: none"><li>• Atualização para a versão 2 para conformidade com o IVDR</li><li>• Seções para Substâncias interferentes, Contaminação cruzada, Estabilidade do eluato e Compatibilidade com aplicações a jusante adicionadas</li></ul>

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o respectivo manual do kit QIAGEN. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, iTherascreen® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Os nomes registrados, as marcas comerciais etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN. Todos os direitos reservados.



