



Юни 2022 г.

QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit

Инструкции за употреба (Работни характеристики)

Версия 2



За ин витро диагностика
За употреба с QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Германия

R1

Работните характеристики могат да бъдат намерени в раздела Resource (Ресурси) на продуктовата страница на www.qiagen.com.

Обща информация

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit представлява система, която използва технология с кварцова мембрана (технология QIAamp) за изолиране и пречистване на геномна ДНК от биологични проби, фиксирани с формалин, вградени в парафин (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Наборът е предназначен за ръчно приготвяне на аликвотни части и не предоставя качествени и количествени резултати от тестове.

Работни характеристики

Забележка: Работните характеристики до голяма степен зависят от различни фактори и са свързани със специфичното приложение надолу по веригата. Те са установени за набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit във връзка с примерни типове фиксирани във формалин, вградени в парафин тъкани (FFPE тъкани) и примерни приложения надолу по веригата. Въпреки това, методите за изолиране на нуклеинови киселини се използват във връзка с различни биологични проби и като „front-end“ за множество приложения надолу по веригата. Параметри за ефективност като кръстосано замърсяване или повторяемост и възпроизводимост трябва да бъдат установени за всеки такъв работен процес като част от разработването на приложения надолу по веригата. Следователно, отговорност на потребителя е да валидира целия работен процес, за да установи подходящи параметри за ефективност.

Основни работни характеристики и съвместимост с различни приложения надолу по веригата

Анализ надолу по веригата

Елуираната геномна ДНК е готова за използване в различни анализи надолу по веригата, включително различни инвитро диагностични анализи надолу по веригата. Вижте наръчника на съответния набор на QIAGEN® за повече информация относно ефективността на конкретната система.

Добив на пречистена ДНК

Аликвотните част от фиксирани във формалин, вградени в парафин тъкани (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) може да показват висока степен на тъканна хетерогенност. Освен това, тъканната повърхност в аликвотните части от FFPE е силно променлива, което води до променливо количество и качество на извлечената ДНК. Следователно, потребителят трябва да оптимизира броя на срезовете, дебелината на среза и повърхностната площ на среза за целевата аликвотна част и всички процедури, използвани в лабораторията си, за да получи ДНК с подходящо количество и качество за специфичните приложения надолу по веригата.

Ако наборът се използва във връзка с приложение на QIAGEN надолу по веригата, вижте инструкциите в съответния наръчник.

Недостатъчната тъканна дехидратация по време на подготовка на FFPE тъканта, поставянето на твърде много парафин с аликвотната част в епруветката за екстракция, използването на етанол с по-ниска чистота (не молекулярно-биологичен клас) от препоръчания или задържането на ксилен или етанол в аликвотната част може да доведе до неоптимална екстракция и ниско количество и качество на ДНК.

Повтаряемост

Повторяемостта е оценена с помощта на 6 FFPE клетъчни линии, генерирани от човешки клетки, фиксирани във формалин и вградени в парафин. Аликвотните части са тествани с основна смес QuantiTect® SYBR® Green master mix и β-актин ген-специфични праймери на апарат за цикли Rotor-Gene® Q за real-time PCR. PCR реакциите се провеждат за 174-bp и за 218-bp фрагмент от човешкия β-актин ген.

За статистическия анализ са използвани 72 точки от данни за всеки размер на фрагмента. Статистическият анализ включва изчисляването на стандартното отклонение (Standard Deviation, SD) и горните и долните 95% доверителни интервали. Вариацията е оценена с помощта на анализ на компонентите на дисперсията като стандартно отклонение за фрагмента от 218 bp (SD: 0,342 CT; долна 95% доверителна граница: 0,291; горна 95% доверителна граница: 0,413). Това може да се използва като оценка на повторяемостта на процеса на екстракция. Изчислената вариация за 174-bp фрагмент е 0,258 CT; долна 95% доверителна граница: 0,220; горна 95% доверителна граница: 0,312.

Възпроизводимост

Оценката на възпроизводимостта е извършена в три лаборатории, като се използват 3 клинични проби, фиксирани във формалин и вградени в парафин (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE), съдържащи тъкан от недребноклетъчен рак на белия дроб (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): една мутация, съдържаща делеция 6223, една мутация, съдържаща L858R, и една, съдържаща див тип (Wild-Type, WT) проба. Клиничните проби от FFPE са избрани въз основа на техния известен статус на мутация според секвенирането на Sanger.

За всяка от клиничните проби от FFPE с мутации са рандомизирани по двойки 48 последователни секции от FFPE, за да бъдат използвани при екстракция и разделени на три партиди – по една партида на всеки център по изпитването.

Екстракциите са извършени двукратно във всеки от центровете по изпитването. Всеки център използва една уникална партида от набори за екстракция QIAamp FFPE DNA DSP Kit. Оценките на пробите и мутациите във всичките три центъра са извършени с помощта на набора *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit. Пробите са тествани в 3 непоследователни дни за период от 6 дни. Всяка проба е тествана 6 пъти във всеки център по изпитването, което дава общо 18 точки от данни за проба.

За всички аликвотни части, и в трите центъра, са демонстрирани 100% правилни сигнали за мутация.

Линейност

Наборът QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit може да се използва за изолиране на ДНК от различни видове тъкани. Линейният диапазон трябва да бъде установен според изискванията на клиента и валидиран за конкретната употреба. Очакват се различни линейни диапазони за различните видове тъкани в зависимост от тъканното натоварване в системата, както и от характеристиките на тъканта.

Интерфериращи вещества

Наборът QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit може да се използва за изолиране на ДНК от различни видове тъкани. Потенциално интерфериращите вещества могат да произхождат от различни източници, например естествени метаболити, специфични за типа тъкан и орган, метаболити, произведени по време на патологични състояния, вещества, въведени по време на лечението на пациента, или вещества, погълнати от пациента.

Тестването за интерфериращи вещества е извършено с помощта на набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit за подготовка на аликвотните части във връзка с примерни приложения надолу по веригата за оценка на качеството на извлечените нуклеинови киселини. Примери за тестваните набори за диагностика на QIAGEN са изброени в Таблица 1.

Различните приложения надолу по веригата обаче може да имат различни изисквания по отношение на чистотата (т.е. липса на потенциални интерфериращи вещества) и интерферентите, присъстващи в конкретната аликвотна част, може да са различни. Следователно идентифицирането, тестването и контролът на съответните интерфериращи вещества също трябва да бъдат установени като част от специфичния диагностичен работен процес, включващ набора QIAamp DSP FFPE Tissue Kit и специфичното приложение надолу по веригата.

Таблица 1. Проучване на интерфериращите вещества при анализ надолу по веригата

Набор за диагностика	Тествани интерфериращи вещества	Заклучение
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Парафинов восък Ксилен Етанол Buffer ATL Протеиназа K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Хемоглобин	Пет алиquotни части с мутации (всяка представляваща един от анализите в набора PIK3CA) и една алиquotна част с мутация от див тип са примесени с 9 потенциално интерфериращи вещества и тествани за техния ефект върху средния ΔCt и мутационния сигнал. Данните от това проучване показват, че тестваните интерфериращи вещества нямат въздействие върху алиquotните части с мутации или тези от див тип при използваните концентрации. Наблюдаваната значима разлика е в рамките на 3x междинното ниво на точност за анализа и следователно – в рамките на стандартната за анализа дисперсия. Всички сигнали за мутация в алиquotните части с мутации и в тези от див тип са според очакваната. Данните, наблюдавани в това проучване, показват, че проучването отговаря на критериите за приемливост.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Парафинов восък Ксилен Етанол Buffer ATL Протеиназа K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Това проучване е предназначено за оценка на ефектите на потенциалните интерфериращи вещества върху ефективността на набора KRAS. За алиquotните части с мутации целта е да се докаже, че средните стойности на анализа в алиquotните части с интерфериращо вещество не се различават значително от тези без интерфериращо вещество. За алиquotните части с мутации от див тип целта е да се докаже, че наличието на интерфериращо вещество не трябва да причинява фалшиво положителни резултати. Налице са две комбинации анализ/интерфериращо вещество, водещи до фалшиво положителни резултати. Въпреки това, и двете са в ниското ниво на ксилен без сравними фалшиво положителни резултати в алиquotните части с високо ниво. И двете цели са постигнати, потвърждавайки хипотезата, че никое вещество от набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit в концентрациите при нормална употреба не пречи на способността на набора KRAS да прави разлика между положителни и отрицателни за мутация алиquotни части.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Парафинов восък Ксилен Етанол Buffer ATL Протеиназа K Buffer AW1 Buffer AW2	Целта на това проучване е да се провери въздействието на потенциално интерфериращите вещества, използвани в процеса на екстракция, върху работата на набора <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (набор EGFR), когато се използва на платформата QIAGEN Rotor-Gene Q MDx platform (RGQ). За това проучване са избрани осем стандартни алиquotни части от FFPE, представляващи всеки от 7-те анализа на мутация на EGFR плюс един див тип (Wild-Type, WT). Изчислените разлики в средните стойности на ΔCt за всеки от стандартите от FFPE с мутации между всяко от двете нива на интерфериращите вещества и „празните“ репликати или не се различават значително от нула, или се считат за малки със стойност по-малка от 1 Ct. Всички репликати с мутации имат сигнал за мутация, открит при всяко от ниските и високите интерферентни нива за всички интерферентни вещества. Всички репликати от див тип имат сигнал за алиquotна част с мутация, който не е открит при всяко от ниските и високите интерферентни нива за всички интерфериращи вещества. Проучването потвърждава, че реактивите, използвани в набора за извличане на FFPE, не влияят на работата на набора EGFR.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Парафинов восък Ксилен Етанол Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Проучването има за цел да демонстрира, че наличието на потенциално интерфериращо вещество (от набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (набор FFPE Extraction Kit)) няма да доведе до фалшиво положителни или фалшиво отрицателни резултати за набора KRAS System NSCLC; това означава, че сигнала за мутация ще бъде засенат или ще доведе до „отрицателен резултат за безопасност“ (fail-safe) чрез генериране на невалидно състояние на алиquotната част. Идентифицирани са осем потенциално интерфериращи вещества от процеса на извличане на ДНК. Всяко вещество е тествано срещу 8 клетъчни линии от FFPE, представляващи всяка от 7-те мутации, открити от набора KRAS Kit NSCLC Kit, и една алиquotна част с мутация. Алиquotните части с мутация са тествани на ниво, съответстващо на приблизително 3 пъти границата на откриване (3 x LOD). Проучването показва, че тестваните вещества не са оказали неблагоприятен ефект върху ефективността на анализа при ниво 1x на интерферентното вещество; правилният сигнал за мутация винаги е бил генериран и присъствието на интерфериращото вещество не е имало статистически значим ефект върху разликата в ΔCt при повечето тествани състояния на алиquotни части (58 от 64 състояния, на ниво 1x). За 6-те алиquotни части със статистически значима разлика, наблюдаваната разлика в средните стойности за всяка алиquotна част е в рамките на критерия за приемане на изследването от $\pm 2 \times SD$ (оценка на SD, взета от доклада за изследване на повторемостта и възпроизводимостта). Проучването също така демонстрира, че анализът е толерантен към високи нива на всяко от веществата в сравнение с очакваното пренасяне, т.е. правилното генериране на сигнал за мутация е извършено, когато интерфериращото вещество присъства в 10x най-високата очаквана концентрация.

Направете справка с наръчните на наборите за повече информация относно интерфериращите вещества в конкретни приложения на QIAGEN надолу по веригата.

Кръстосано замърсяване

За да се оцени нивото на кръстосано замърсяване, са използвани две проби от FFPE клетъчна линия от NSCLC: аликвотна част от див тип (Wild-Type, WT) и аликвотна част от FFPE клетъчна линия, съдържаща мутацията L858R в екзон 21. Проучването има за цел да имитира ситуацията, при която проби, съдържащи високо ниво на мутация, могат да заразят други проби в рамките на процедурата за екстракция. За да се предизвика процедурата е проведено пречистване на ДНК от проби с L858R мутация, разположени до проби от див тип (Wild-Type, WT), като се използва една партида реактиви. Кръстосаното замърсяване е оценено с помощта на набора *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Резултатите не показват кръстосано замърсяване в цялата система.

Ефективност на елуата от ДНК, извлечен чрез QIAamp DSP DNA FFPE с помощта на Pyrosequencing® и базирани на qPCR анализи

ДНК, изолирана от FFPE тъкан, се разрежда до концентрация на ДНК от 2 ng/μl за анализ с помощта на *therascreen* EGFR Pyro Assay. Във всички серии, използвани за определяне на характеристиките на ефективността, сигналът за всички кодони е над 30 RLU (относителни светлинни единици) и всички проби са с правилен медицински резултат за анализа на мутациите.

ДНК, изолирана от FFPE тъкан на пациенти с колоректален рак, недребноклетъчен рак на белия дроб и рак на гърдата, е използвана директно в наборите *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit и *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Стойностите на Ct на ДНК, извлечена с помощта на набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, са в рамките на параметрите на работния диапазон, определени за всеки анализ и подробно описани в съответните наръчници.





Стабилност на елуата

Стабилността на елуата ще зависи от съдържанието и вида на съвместно пречистените примеси (свързани с типа тъкан), обема на елуирането и условията на съхранение. Препоръчваме на потребителите да установят стабилността на елуата според техните специфични изисквания.

Ако наборът се използва във връзка с приложение на QIAGEN надолу по веригата, вижте инструкциите в ръководството на съответния набор. Примерно проучване за проверка на стабилността показва, че ДНК, извлечена от FFPE тъканни проби, е подходяща за използване с набор *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, когато се съхранява до 7 дни при 4°C с допълнително съхранение при -20°C за общо до пет седмици с множество цикли на замразяване/размразяване.

СИМВОЛИ

В този документ може да са изобразени следните символи. За пълен списък на символите, използвани в инструкциите за употреба или върху опаковката и етикета, вижте ръководството.

Символ	Описание на символа
	Този продукт отговаря на изискванията на Европейски регламент 2017/746 за медицински изделия за инвитро диагностика.
	Медицинско изделие за инвитро диагностика
	Каталожен номер
Rn	„R“ означава редакция на Инструкциите за употреба, а „n“ е номерът на редакцията
	Производител

История на редакции

Редакция	Описание
R1, юни 2022 г.	Версия 2, Редакция 1 <ul style="list-style-type: none">Актуализация на версията до версия 2 за съответствие с IVDRДобавени са раздели за интерфериращи вещества, кръстосано замърсяване, стабилност на елуата и съвместимост с приложения надолу по веригата

За актуална информация относно лицензирането и заявления за освобождаване от отговорност за конкретни продукти вижте съответния наръчник или ръководство за потребителя на набора QIAGEN. Наръчниците и ръководствата за потребителя на набори QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за техническо обслужване на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Търговски марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Регистрираните имена, търговските марки и пр., използвани в настоящия документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не се считат за незащитени от закона.
06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, всички права запазени.

