



2022. gada jūnijs

QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit komplekta lietošanas instrukcijas (Veiktspējas raksturojums)

Versija 2



Lietošanai in vitro diagnostikā
Izmantošanai ar QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Vācija

R1

Veiktspējas raksturojums ir pieejams elektroniski, un tas ir atrodams produkta lapas cilnē Resources (Resursi), vietnē www.qiagen.com.

Vispārīgs ievads

Komplekts QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ir sistēma, kurā tiek izmantota silīcija dioksīda membrānas tehnoloģija (QIAamp tehnoloģija) genomiskās DNS izolēšanai un izdalīšanai no formalīnā fiksētiem un parafīnā iegultiem (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) bioloģiskajiem paraugiem.

Tas ir paredzēts manuālas paraugu sagatavošanas nolūkiem un nesniedz ne kvalitatīvus, ne kvantitatīvus rezultātus.

Veiktspējas raksturojums

Piezīme. Veiktspējas raksturojums ir ļoti atkarīgs no dažādiem faktoriem, un tas ir saistīts ar konkrētu pakārtoto lietojumu. Šis raksturojums QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit komplektam ir noteikts kombinācijā ar tipiskiem FFPE iegulto audu tipiem un tipiskajiem pakārtotajiem lietojumiem. Taču metodes nukleīnskābju izolēšanai tiek izmantotas kopā ar dažādiem bioloģiskajiem paraugiem un kā priekšējā apstrāde vairākiem pakārtotajiem lietojumiem. Veiktspējas parametri, tādi kā krusteniskā kontaminācija vai izpildes atkārtamība un reproducējamība, ir jānosaka ikkatrai šādai darbplūsmai, un šāda noteikšana veido daļu no pakārtotā lietojuma izstrādes. Tādēļ lietotājs ir atbildīgs par visas darbplūsmas validēšanu, lai noteiktu piemērotos veiktspējas parametrus.

Pamata veiktspēja un saderība ar dažādiem pakārtotajiem lietojumiem

Pakārtotā analīze

Eluētā genomiskā DNS ir gatava lietošanai dažādās pakārtotajās analīzēs, tostarp dažādās in vitro diagnostikas pakārtotajās analīzēs. Plašāku informāciju par konkrētu sistēmas veiktspēju skatiet attiecīgā QIAGEN® komplekta rokasgrāmatā.

Izdalītās DNS iegūtais daudzums

Formalīnā fiksēti un parafīnā iegulti (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) paraugi var uzrādīt augstu audu heterogenitātes līmeni. Turklāt audu virsmas laukums FFPE paraugos ir ļoti mainīgs, tādēļ ekstrahētās DNS daudzums un kvalitāte var būt mainīgi. Tādēļ lietotājam ir jāoptimizē sekciju skaits, sekcijas biezums un sekcijas virsmas laukums saviem interesējošajiem paraugiem un visām lietotāja laboratorijā izmantotajām procedūrām, lai iegūtu piemērota daudzuma un kvalitātes DNS saviem konkrētajiem pakārtotajiem lietojumiem.

Ja komplektu izmanto kopā ar QIAGEN pakārtoto lietojumu, instrukcijas skatiet attiecīgajā rokasgrāmatā.

Ja izmantojat nepietiekamu audu dehidratāciju FFPE audu sagatavošanas laikā, pievienojat pārāk daudz parafīna ekstrahēšanas stobriņā kopā ar paraugu, izmantojas zemākas tīrības pakāpes (nevis molekulārās bioloģijas pakāpes) etanolu, nekā ieteicams, vai ksilolu vai etanolu paturat paraugā, ekstrahēšana var būt suboptimāla un DNS daudzums un kvalitāte var būt zemi.

Atkārtamība

Atkārtamība tika novērtēta, izmantojot 6 FFPE šūnu līnijas, kas ģenerētas no formalīnā fiksētām un parafīnā iegultām cilvēka šūnām. Paraugi tika testēti ar QuantiTect® SYBR® Green pamatmaisījumu un β aktīna gēnam specifiskiem praimeriem kopā ar Rotor-Gene® Q real-time PCR cikleri. PCR reakcijas tika veiktas cilvēka β aktīna gēna 174 bp fragmentam un 218 bp fragmentam.

Statistikajai analīzei katram fragmenta lielumam tika izmantoti 72 datu punkti. Statistikajā analīzē ietilpa standartnovirzes (Standard Deviation, SD) un augšējās un apakšējās 95% ticamības robežas aprēķins. Mainīgums tika novērtēts, izmantojot dispersijas komponenta analīzi kā standartnovirzi 218 bp fragmentam (SD: 0,342 CT; apakšējā 95% ticamības robeža: 0,291; augšējā 95% ticamības robeža: 0,413). To var izmantot kā atkārtamības novērtējumu ekstrahēšanas procesam. Novērtētais mainīgums 174 bp fragmentam bija 0,258 CT; apakšējā 95% ticamības robeža: 0,220; augšējā 95% ticamības robeža: 0,312.

Reproducējamība

Reproducējamības novērtējums tika veikts trīs laboratorijās, izmantojot 3 klīniskus FFPE paraugus, kuros bija nesīkšūnu plaušu vēža (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) audi: vienā bija delēcijas 6223 mutācija, vienā bija L858R mutācija, un vienā bija savvaļas tipa (Wild-Type, WT) paraugs. Klīniskie FFPE paraugi tika atlasīti, balstoties uz to zināmo mutāciju statusu saskaņā ar Sengera sekvencēšanu.

Katram no mutanta klīniskajiem FFPE paraugiem 48 secīgas FFPE sekcijas tika randomizēti sakārtotas pāros, ko izmantot ekstrahēšanā, un sadalītas trīs partijās, pa vienai partijai katrā testa vietā.

Ekstrahēšanas katrā testa vietā tika veiktas divos eksemplāros. Katrā vietā ekstrahēšanai tika izmantota viena unikāla QIAamp FFPE DNA DSP Kit komplektu partija. Paraugu novērtēšana un mutācijas novērtēšana tika veiktas, izmantojot *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit komplektu visās trīs vietās. Paraugi tika testēti 3 neseicīgas dienas 6 dienu periodā. Katrs paraugs katrā vietā tika testēts 6 reizes, tātad kopā tika iegūti 18 datu punkti katram paraugam.

Visiem paraugiem visās trīs vietās uzrādījās 100% pareizas mutāciju nosaukšanas.

Linearitāte

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit komplektu var izmantot DNS izolēšana no dažāda tipa audiem. Lineārais diapazons ir jānosaka atbilstoši klienta prasībām, un to ir nepieciešams validēt konkrētajam lietojumam. Dažādiem audu tipiem ir sagaidāmi dažādi lineārie diapazoni atkarībā no sistēmā ievietotajiem audiem un no audu īpašībām.

Interferējošas vielas

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit komplektu var izmantot DNS izolēšana no dažāda tipa audiem. Potenciāli interferējošas vielas var rasties no dažādiem avotiem, piemēram, no audu tipam un orgānam specifiskajiem dabīgiem metabolītiem, patoloģiskos apstākļos radītajiem metabolītiem, vielām, kas ievadītas pacienta ārstēšanas laikā, vai vielām, ko pacients ir lietojis iekšķīgi.

Interferējošo vielu testēšana tika veikta, izmantojot QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit komplektu paraugu sagatavošanai kopā ar tipiskajiem pakārtotajiem lietojumiem ekstrahēto nukleīnskābju kvalitātes novērtēšanai. Testēto diagnostikas QIAGEN komplektu piemēri ir uzskaitīti šeit: Tabula 1.

Taču dažādiem pakārtotajiem lietojumiem var atšķirties prasības attiecībā uz tīrību (t.i., potenciāli interferējošu vielu neesamību), un konkrētajā paraugā esošās interferējošas vielas var būt daudzveidīgas. Tāpēc konkrētas diagnostikas darbplūsmas izstrādes gaitā ir jānosaka arī attiecīgo interferējošo vielu identificēšana, testēšana un kontrole ikvienai darbplūsmai, kur iesaistīts QIAamp DSP FFPE Tissue Kit komplekts un konkrētais pakārtotais lietojums.

Tabula 1. Pakārtotas analīzes interferējošu vielu pētījums

Diagnostikas komplekts	Testētās interferējošās vielas	Secinājums
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Parafīna vasks Ksilols Etanols Buffer ATL Proteināze K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobīns	Pieci mutanta paraugi (katrs pārstāv vienu no PIK3CA Kit komplekta analīzēm) un viens WT paraugs tika papildināti ar 9 potenciāli interferējošām vielām un testēti attiecībā uz to ietekmi uz vidējo ΔCt un mutācijas nosaukšanu. Dati no šī pētījuma uzrāda, ka testētās traucējošās vielas izmantotajās koncentrācijās nekādi neietekmē mutanta vai WT paraugus. Gadījumos, kad tika novērota būtiska atšķirība, šī vērtība iekļāvās analīzes trīskārtējā (3x) starpprecizitātē un tādējādi bija analīzes dabiskā mainīguma robežās. Visas mutācijas nosaukšanas gan mutanta, gan WT paraugos atbilda paredzētajām. Šajā pētījumā novērotie dati liecina, ka pētījums atbilda pieņemamības kritērijiem.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Parafīna vasks Ksilols Etanols Buffer ATL Proteināze K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Šis pētījums tika izstrādāts ar mērķi novērtēt potenciāli interferējošu vielu ietekmi uz KRAS Kit komplekta veikspēju. Mutanta paraugiem mērķis bija demonstrēt, ka vidējās analīzes vērtības paraugos ar interferējošām vielām būtiski neatšķiras no vērtībām paraugos bez šīm interferējošajām vielām. Savvaļas tipa (Wild-Type, WT) paraugiem mērķis bija demonstrēt, ka interferējošās vielas klātesamībai nevajadzētu radīt aplami pozitīvus rezultātus. Aplami pozitīvi rezultāti tika iegūti divās analīzes/interferējošās vielas kombinācijās. Taču tie abi bija ar zema līmeņa ksilolu, un augsta līmeņa paraugos salīdzināmu aplami pozitīvu rezultātu nebija. Abi šie mērķi tika sasniegti, apstiprinot hipotēzi, ka neviena no QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit komplekta vielām normālas lietošanas koncentrācijās neapgrūrina KRAS Kit komplekta spēju mutācijas pozitīvus paraugus atšķirt no mutācijas negatīviem paraugiem.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Parafīna vasks Ksilols Etanols Buffer ATL Proteināze K Buffer AW1 Buffer AW2	Šī pētījuma mērķis bija verificēt ekstrahēšanas procesā izmantoto potenciāli interferējošu vielu ietekmi uz <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) komplekta veikspēju, to izmantojot QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Platform (RGQ). Šim pētījumam tika izvēlēti astoņi FFPE standarta paraugi, kas pārstāv katru no 7 EGFR mutācijas analīzēm, plus viens savvaļas tipa (Wild-Type, WT) paraugs. Aplētās atšķirības vidējās ΔCt vērtībās katram no mutanta FFPE standarta paraugiem starp katru no abiem interferējošu vielu līmeņiem un "tukšajiem" atkārtojumiem vai nu būtiski neatšķīrās no nulles vai tika uzskatītas par mazām, to vērtībai nepārsniedzot 1Ct. Visiem mutanta atkārtojumiem mutācijas nosaukšana atbilda noteiktajai mutācijai katrā no zemajiem un augstajiem interferējošās vielas līmeņiem visām interferējošajām vielām. Visiem WT atkārtojumiem parauga mutācijas statuss bija "mutācija nav noteikta" katrā no zemajiem un augstajiem interferējošās vielas līmeņiem visām interferējošajām vielām. Pētījumā apstiprinājās, ka FFPE Extraction Kit komplektā izmantotie reaģenti neietekmē EGFR Kit komplekta veikspēju.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Parafīna vasks Ksilols Etanols Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Šis pētījums tika izstrādāts ar mērķi demonstrēt, ka potenciāli interferējošās vielas klātesamība (no QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit komplekta (FFPE ekstrahēšanas komplekts)) neradītu aplami pozitīvus vai aplami negatīvus rezultātus KRAS System NSCLC komplektam; tas ir, tiktu ietekmēta mutācijas nosaukšana vai izraisīta sistēmas "drošatteice", uzrādot nederīgu parauga statusu. No DNS ekstrahēšanas procesa tika identificētas astoņas potenciāli interferējošās vielas. Katra viela tika testēta pret 8 FFPE šūnu līnijām, kas pārstāv katru no KRAS Kit NSCLC Kit komplekta konstatētajām 7 mutācijām, un viens savvaļas tipa (Wild-Type, WT) paraugs. Mutācijas paraugi tika testēti līmenī, kas atbilst aptuveni trīskārtējai (3x) konstatēšanas robežai (3 x LOD). Pētījumā tika demonstrēts, ka testētajām vielām nebija nekādas nelabvēlīgas ietekmes uz analīzes veikspēju vienkārtējā (1x) interferenta līmenī; vienmēr bija pareizā mutācijas nosaukšana un interferējošās vielas klātesamībai nebija statistiski nozīmīgas ietekmes uz ΔCt starpību vairumā testēto parauga apstākļu (58 apstākļos no 64, 1x līmenī). Tiem 6 paraugiem, kam neuzrādījās statistiski nozīmīga atšķirība, novērotā vidējo vērtību atšķirība katram paraugam iekļāvās pētījuma pieņemamības kritērija $\pm 2 \times SD$ robežās (SD aplēse ņemta no atkārtojamības un reproducējamības pētījuma atskaites). Pētījumā tika arī demonstrēts, ka pret augstākiem katras vielas līmeņiem analīze bija pielaidīga nekā pret paredzēto pānesi, t.i., pareizā mutācijas nosaukšana tika uzrādīta arī tad, kad interferējošās vielas klātesamība bija desmit reizes (10x) lielāka par augstāko paredzēto koncentrāciju.

Plašāku informāciju par interferējošām vielām konkrētos QIAGEN pakārtotajos lietojumos skatiet komplekta rokasgrāmatās.

Krusteniskā kontaminācija

Lai novērtētu krusteniskā kontaminācija līmeni, tika izmantoti divi FFPE šūnu līnijas NSCLC paraugi: WT un FFPE šūnu līnijas paraugs, kurā ir 21. eksona L858R mutācija. Pētījuma mērķis bija imitēt situāciju, kur paraugi, kuros ir augsts mutācijas līmenis, ekstrakcijas procedūras laikā var krusteniski kontaminēt citus paraugus. Lai procedūru pārbaudītu, DNS izdalīšana tika veikta, izdalot DNS no L858R mutanta paraugiem, kas novietoti blakus WT paraugiem, izmantojot vienu reaģentu partiju. Krusteniskā kontaminācija tika novērtēta, izmantojot *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit komplektu. Rezultāti uzrādīja krusteniskās kontaminācijas neesamību visā sistēmā.

QIAamp DSP DNA FFPE DNA eluāta veikspēja Pyrosequencing® un uz qPCR balstītās analīzēs

No FFPE audiem izolētā DNS tika atšķaidīta līdz DNS koncentrācijai 2 ng/μl, lai veiktu analīzi, izmantojot *therascreen* EGFR Pyro Assay. Visās izpildēs, kas izmantotas veikspējas raksturojuma noteikšanai, signāls pārsniedza 30 RLU (relative light units, relatīvās gaismas vienības) visiem kodoniem un visiem paraugiem bija pareizs medicīniskais iznākums mutāciju analīzei.

Komplektos *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit un *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit tika tieši izmantota no FFPE audiem izolētā DNS, kas iegūta no pacientiem ar kolorektālo vēzi, nesīkšūnu plaušu vēzi un krūts vēzi. Ct vērtības tai DNS, kas ekstrahēta, izmantojot QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit komplektu, iekļāvās katrai analīzei definētajos un attiecīgajās rokasgrāmatās norādītajos darba diapazona parametros.





Eluātu stabilitāte

Eluātu stabilitāte ir atkarīga no līdizdalīto piemaisījumu (saistīti ar audu tipu) satura un tipa, eluēšanas tilpuma un glabāšanas apstākļiem. Lietotājiem ieteicams noskaidrot eluātu stabilitāti atbilstoši savām konkrētajām vajadzībām.

Ja komplekts tiek izmantots kopā ar QIAGEN pakārtoto lietojumu, instrukcijas skatiet attiecīgā komplekta rokasgrāmatā. Tipiskās stabilitātes verificēšanas pētījumā tika demonstrēts, ka no FFPE audu paraugiem ekstrahētā DNS ir piemērota izmantošanai ar *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit komplektu, ja tiek glabāta maksimāli 7 dienas 4 °C temperatūrā ar papildu glabāšanu –20 °C temperatūrā kopā maks. piecas nedēļas ar vairākiem sasaldēšanas/atkausēšanas cikliem.

Simboli

Šajā dokumentā ir redzami tālāk aprakstītie simboli. Pilnu sarakstu ar lietošanas instrukcijās un uz iepakojuma un marķējuma izmantotajiem simboliem, lūdzu, skatiet rokasgrāmatā.

Simbols	Simbola definīcija
	Šis produkts atbilst prasībām, ko nosaka Eiropas Regula 2017/746 par in vitro diagnostikas medicīniskajām ierīcēm.
	In vitro diagnostikas medicīniskā ierīce
	Kataloga numurs
Rn	R apzīmē lietošanas instrukciju redakciju, bet n ir redakcijas numurs
	Ražotājs

Redakciju vēsture

Redakcija

R1, 2022. gada jūnijs

Apraksts

Versija 2, redakcija 1

- Atjauninājums versijai 2 par atbilstību IVDR
- Pievienotas sadaļas Interferējošas vielas, Krusteniskā kontaminācija, Eluāta stabilitāte un Saderība ar pakārtotajiem lietojumiem

Jaunāko informāciju par licencēšanu un produktiem specifiskās atrunas skatiet attiecīgajā QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja rokasgrāmatā. QIAGEN komplekta rokasgrāmatas un lietotāja rokasgrāmatas ir pieejamas vietnē www.qiagen.com, un tās var pieprasīt arī no QIAGEN tehniskā atbalsta dienesta vai vietējiem preču izplatītājiem.

Preču zīmes: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Tiek uzskatīts, ka šajā dokumentā minētie reģistrētie nosaukumi, preču zīmes utt. ir aizsargāti ar likumu arī tad, ja tas nav īpaši norādīts.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, visas tiesības paturētas.

