

„QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit“ naudojimo instrukcija (eksploatacinių ypatybių charakteristikos)

2 versija



Skirta *in vitro* diagnostikai

Skirta naudoti su „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Vokietija

R1

Eksploatacinių ypatybių charakteristikos pasiekiamos elektroniniu būdu. Jas taip pat galima rasti gaminio puslapio išteklių skirtuke adresu www.qiagen.com.

Bendrasis įvadas

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ sistema, naudodama silicio dioksido membranos technologiją („QIAamp“ technologiją), atskiria ir išgrynina genominę DNR iš formalinu fiksuotų parafine esančių (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) biologinių bandinių.

Ji skirta neautomatiniam mėginio paruošimui ir nepateikia jokių – nei kokybinių, nei kiekybinių – testo rezultatų.

Eksploatacinių ypatybių charakteristikos

Pastaba. Eksploatacinių ypatybių charakteristikos labai priklauso nuo įvairių veiksnių ir yra susijusios su konkrečiomis pasrovinio pritaikymo procedūromis. Jos buvo nustatytos „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ kartu su pavyzdiniais FFPE esančiais audinio tipais ir naudojant pavyzdines pasrovinio pritaikymo procedūras. Tačiau nukleorūgščių atskyrimo metodai naudojami kartu su skirtingais biologiniais mėginiais ir kaip gryninimas keliuose pasroviniuose pritaikymuose. Eksploatacinių ypatybių parametrai, pvz., kryžminė tarša arba pasikartojamumo ar atkartojamumo vykdymas, turi būti nustatyti tokiai darbo eigai, kaip pasrovinio pritaikymo tobulinimo dalis. Todėl naudotojas turi patvirtinti visą darbo eigą, kad būtų nustatyti tinkami eksploatacinių ypatybių parametrai.

Pagrindinės eksploatacinės ypatybės ir suderinamumas su įvairiomis pasrovinio pritaikymo procedūromis

Paskesnė analizė

Eliuota genominė DNR yra paruošta naudoti įvairiuose tolesniuose tyrimuose, įskaitant įvairius tolesnius *in vitro* diagnostinius tyrimus. Daugiau informacijos apie konkrečios sistemos eksploatacines ypatybes rasite atitinkamame QIAGEN® rinkinio vadove.

Išgrynintosios DNR išeiga

Formaline fiksuoti parafine esantys (FFPE) mėginių audiniai gali tapti itin heterogeniški. Be to, FFPE mėginių audinio paviršiaus plotas labai kinta, todėl išgautos DNR kiekis ir kokybė labai skiriasi. Naudotojas turėtų optimizuoti dominančio mėginio pjūvių skaičių, pjūvio storį, pjūvio paviršiaus plotą ir visas laboratorijoje naudojamas procedūras, kad gautų tinkamo kiekio ir kokybės DNR konkrečioms pasrovinio pritaikymo procedūroms.

Jei rinkinys naudojamas kartu su QIAGEN pasrovinio pritaikymo procedūromis, vadovaukitės atitinkamame vadove pateiktomis instrukcijomis.

Nepakankama audinių dehidratacija ruošiant FFPE audinius, per didelis kiekis parafino, patekęs su mėginiu į išskyrimo mėgintuvėlį, naudojant mažesnio grynumo etanolį (ne molekulinės biologijos klasės) nei rekomenduojama, arba ksileno ar etanolio išlikimas mėginyje gali lemti neoptimalų išskyrimą, mažą DNR kiekį ir netinkamą jos kokybę.

Pakartojamumas

Pakartojamumas buvo įvertintas naudojant 6 FFPE ląstelių linijas, sugeneruotas iš žmogaus ląstelių, fiksuotų formaline ir esančių parafine. Mėginiai buvo tiriami naudojant „QuantiTect® SYBR® Green“ pagrindinį mišinį ir specifinius β aktino geno pradmenis kartu su „Rotor-Gene® Q real-time PCR“ ciklų valdikliu. PGR reakcijos buvo atliktos su žmogaus β aktino geno 174 bp fragmentu ir 218 bp fragmentu.

Statistinei analizei buvo naudojami 72 kiekvieno fragmento dydžio duomenų taškai. Statistinė analizė apėmė standartinio nuokrypio (SN) ir viršutinės bei apatinės 95 % patikimumo intervalo ribų apskaičiavimą. Variacija buvo įvertinta naudojant dispersinio komponento analizę kaip standartinį 218 bp fragmento nuokrypį (SN: 0,342 CT; apatinė 95 % patikimumo intervalo riba: 0,291; viršutinė 95 % patikimumo intervalo riba: 0,413). Tai gali būti naudojama kaip išskyrimo proceso pakartojamumo įvertinimas. Apskaičiuota 174 bp fragmento variacija buvo 0,258 CT; apatinė 95 % patikimumo intervalo riba: 0,220; viršutinė 95 % patikimumo intervalo riba: 0,312.

Atkartojamumas

Atkartojamumo įvertinimas buvo atliktas trijose laboratorijose naudojant 3 klinikinius FFPE mėginius, kuriuose buvo nesmulkiąstelinio plaučių vėžio („Non-Small Cell Lung Cancer“, NSCLC) audinio: viename buvo delecijos 6223 mutacija, antrame – L858R mutacija, o trečiame – laukinio tipo („Wild-Type“, WT) mėginys. Klinikiniai FFPE mėginiai buvo atrinkti pagal žinomą jų mutacijos būseną pagal Sangerio sekoskaitą.

Kiekvienam mutaciniam klinikiniam FFPE mėginiui 48 nuoseklios FFPE sekcijos buvo atsitiktinai suskirstytos į poras, kurios buvo naudojamos išskyrimui, ir suskirstytos į tris partijas, po vieną partiją kiekvienai tyrimo vietai.

Išskyrimas kiekvienoje tyrimo vietoje buvo atliktas dviem egzemplioriais. Kiekvienoje vietoje išskiriant buvo naudojama viena unikali „QIAamp FFPE DNA DSP Kits“ partija. Mėginių ir mutacijų įvertinimas visose trijose vietose buvo atliktas naudojant „*therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit“. Mėginiai 6 dienų laikotarpiu buvo tiriami 3 dienas ne iš eilės. Kiekvienas mėginys buvo ištirtas 6 kartus kiekvienoje vietoje, iš viso kiekvienam mėginiui suteikiant 18 duomenų taškų.

Visuose mėginiuose visose trijose vietose pastebėta 100 % tinkamų mutacijos aptikimų.

Tiesiškumas

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ gali būti naudojamas DNR išskirti iš įvairių audinių tipų. Tiesinis diapazonas turi būti nustatytas pagal kliento reikalavimus ir patvirtintas konkrečiam naudojimui. Skirtingiems audinių tipams numatomi skirtingi tiesiniai diapazonai, atsižvelgiant į audinių įkėlimą į sistemą, taip pat į audinių ypatybes.

Trukdančios medžiagos

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ gali būti naudojamas DNR išskirti iš įvairių audinių tipų. Potencialių trukdančių medžiagų kilmė gali būti įvairi, tai gali būti, pvz., audinio tipui ir organui būdingi natūralūs metabolitai, esant patologinėms būklėms susidarantys metabolitai, gydant pacientą patekusios medžiagos arba paciento nurytos medžiagos.

Trukdančių medžiagų tyrimai buvo atlikti naudojant „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“, skirtą mėginiams ruošti pavyzdinėms pasrovinio pritaikymo procedūroms, kad būtų galima įvertinti išskirtų nukleorūgščių kokybę. Ištirtų diagnostinių QIAGEN rinkinių pavyzdžiai išvardyti 1 lentelėje.

Tačiau skirtingoms pasrovinio pritaikymo procedūroms gali būti taikomi skirtingi grynumo (t. y. galimų trukdančių medžiagų nebuvimas) reikalavimai, o konkrečiame mėginyje esančios trukdančios medžiagos gali būti skirtingos. Todėl atitinkamų trukdančių medžiagų identifikavimas, ištyrimas ir kontrolė taip pat turi būti nustatyti kaip specifinės diagnostikos darbo eigos dalis naudojant „QIAamp DSP FFPE Tissue Kit“ ir konkrečią pasrovinio pritaikymo procedūrą.

1 lentelė. Tolesnio tyrimo trukdančių medžiagų tyrimas

Diagnostikos rinkinys	Ištirtos trukdančios medžiagos	Išvada
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Parafinas Ksilenas Etanolis Buffer ATL Proteinazė K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hemoglobinas	Į penkis mutacinius mėginius (kiekvienas atstovavo vienam iš PIK3CA rinkinio tyrimų) ir vieną WT mėginį buvo pridėtos 9 potencialiai trukdančios medžiagos ir ištirtas jų poveikis vidutinėms Δ Ct reikšmėms ir mutacijos aptikimui. Šio tyrimo duomenys rodo, kad ištirtos trukdančios medžiagos neturėjo jokio poveikio naudotų koncentracijų mutaciniams ar WT mėginiams. Kur buvo pastebėtas reikšmingas skirtumas, jis buvo ne daugiau nei 3 kartus didesnis už vidutinį tyrimo tikslumą, todėl neperžengė būdingo tyrimo kintamumo. Visi mutacijų aptikimai tiek mutaciniuose, tiek WT mėginiuose buvo tokie, kokių tikėtasi. Šiame tyrime stebėti duomenys parodė, kad tyrimas atitinka priimtumo kriterijus.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Parafinas Ksilenas Etanolis Buffer ATL Proteinazė K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Šis tyrimas buvo skirtas galimų trukdančių medžiagų poveikiui KRAS rinkinio eksploatacinėms ypatybėms įvertinti. Mutacinių mėginių tikslas buvo parodyti, kad vidutinės tyrimo vertės mėginiuose su trukdančia medžiaga reikšmingai nesiskyrė nuo tų, kuriuose nėra trukdančios medžiagos. WT mėginių tikslas buvo parodyti, kad trukdančios medžiagos buvimas neturėtų sukelti klaidingai teigiamų rezultatų. Buvo naudoti du tyrimo ir trukdančios medžiagos deriniai, kurių rezultatai buvo klaidingai teigiami. Tačiau abiejų derinių ksileno kiekis buvo mažas, o su mėginiais, kuriuose kiekis buvo didelis, negauta jokių panašių klaidingai teigiamų rezultatų. Abu šie tikslai buvo pasiekti patvirtinant hipotezę, kad jokia medžiaga iš „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“, esant įprasto naudojimo koncentracijoms, netrukdo KRAS rinkinio galimybėms atskirti teigiamos mutacijos ir neigiamos mutacijos mėginius.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Parafinas Ksilenas Etanolis Buffer ATL Proteinazė K Buffer AW1 Buffer AW2	Šio tyrimo tikslas buvo patikrinti išskyrimo procese naudojamų potencialiai trukdančių medžiagų poveikį „ <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)“ eksploatacinėms ypatybėms, kai jis naudojamas „QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Platform (RGQ)“. Šiam tyrimui buvo pasirinkti aštuoni FFPE standartiniai mėginiai, atstovaujantys kiekvienam iš 7 EGFR mutacijų tyrimų, ir vienas laukinio tipo („Wild-Type“, WT) mėginys. Apskaičiuoti kiekvieno mutacinio FFPE standarto vidutinį Δ Ct reikšmių skirtumai tarp dviejų lygių trukdančių medžiagų ir tuščių kartotinių mėginių arba reikšmingai nesiskyrė nuo nulio, arba buvo laikomi mažais, nes jų reikšmė buvo mažesnė nei 1 Ct. Visuose mutaciniuose kartotiniuose mėginiuose buvo aptikta mutacija su visų trukdančių medžiagų mažu ir didelio kiekio trukdančiomis medžiagomis. Visuose WT kartotiniuose mėginiuose mutacijos būsenos neaptikta su visų trukdančių medžiagų mažu ir didelio kiekio trukdančiomis medžiagomis. Tyrimas patvirtino, kad FFPE išskyrimo rinkinyje naudojami reagentai neturi įtakos EGFR rinkinio eksploatacinėms ypatybėms.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Parafinas Ksilenas Etanolis Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Tyrimas buvo skirtas parodyti, kad potencialiai trukdančios medžiagos (iš „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ (FFPE išskyrimo rinkinio) buvimas nesukeltų jokių klaidingai teigiamų ar klaidingai neigiamų KRAS sistemos NSCLC rinkinio rezultatų; tai yra mutacijos aptikimas būtų paveiktas arba sistema taptų nesaugi ir pateiktų netinkamą mėginio būseną. Buvo nustatytos aštuonios DNR išskyrimo procesui galimai trukdančios medžiagos. Kiekviena medžiaga buvo išbandyta su 8 FFPE ląstelių linijomis, atstovaujančiomis kiekvienai iš 7 mutacijų, kurias aptiko „KRAS Kit NSCLC Kit“, ir WT mėginiui. Mutacijų mėginiai buvo tiriami lygiu, atitinkančiu maždaug 3 kartus už aptikimo ribą (3 x LoD) didesnę vertę. Tyrimas parodė, kad tirtos medžiagos neturėjo jokio neigiamo poveikio tyrimo eksploatacinėms ypatybėms esant 1x trukdančių medžiagų lygiui; visada buvo tinkamai aptinkama mutacija, o trukdančios medžiagos buvimas neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio Δ Ct skirtumui didžiojoje dalyje tirtų mėginių sąlygų (58 iš 64 sąlygų, 1x lygiu). 6 mėginiuose, kuriuose aptiktas statistiškai reikšmingas skirtumas, pastebėtas kiekvieno mėginio vidurkių skirtumas atitiko tyrimo priimtumo kriterijaus ribas – $\pm 2 \times$ SN (SN įvertis, paimtas iš pasikartojamumo ir atkartojamumo tyrimo ataskaitos). Tyrimas taip pat parodė, kad tyrime buvo toleruojami didesni kiekvienos medžiagos kiekiai, nei tikėtasi, t. y. buvo pateikiamas tinkamas mutacijos aptikimas, kai trukdančios medžiagos koncentracija buvo 10 kartų didesnė nei didžiausia tikėtina.

Norėdami gauti daugiau informacijos apie trukdančias medžiagas konkrečiose QIAGEN pasrovinio pritaikymo procedūrose, žr. rinkinių vadovus.

Kryžminė tarša

Siekiant įvertinti kryžminės taršos lygį, buvo naudoti FFPE ląstelių linijos NSCLC mėginiai: WT ir FFPE ląstelių linijos mėginys, turintis 21 L858R egzono mutaciją. Tyrimu buvo siekiama imituoti situaciją, kai mėginiai, kurių mutacijos lygis didelis, gali kryžminiu būdu užteršti kitus mėginius atliekant išskyrimo procedūrą. DNR gryninimas buvo atliktas norint išbandyti DNR išgryninimo iš L858R mutacinių mėginių, esančių šalia WT mėginių, procedūrą, naudojant vieną reagentų partiją. Kryžminė tarša buvo įvertinta naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Rezultatai neparodė jokios kryžminės taršos visoje sistemoje.

„QIAamp DSP DNA FFPE DNA“ eliuato eksploatacinės ypatybės „Pyrosequencing®“ ir qPCR pagrįstuose tyrimuose

Iš FFPE audinio išskirta DNR buvo atskiesta iki 2 ng/μl DNR koncentracijos analizei naudojant „*therascreen* EGFR Pyro“ tyrimą. Visose tyrimo serijose, kurios buvo atliekamos eksploatacinių ypatybių charakteristikoms nustatyti, signalas buvo didesnis nei 30 santykinų šviesos vienetų („Relative Light Units“, RLU) visuose kodonuose ir visi mėginiai pateikė teisingą medicininį mutacijų analizės rezultatą.

DNR, išskirta iš pacientų, sergančių kolorektaliniu vėžiu, nesmulkiają ląstelinį plaučių vėžiu ir krūties vėžiu, FFPE audinio, buvo tiesiogiai naudojama „*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit“, „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, „KRAS RGQ PCR NSCLC Kit“ ir „*therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit“. DNR, išskirtos naudojant „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“, Ct reikšmės atitiko kiekvienam tyrimui apibrėžtus ir atitinkamuose vadovuose išsamiai aprašytus darbinio diapazono parametrus.





Eliuato stabilumas

Eliuato stabilumas priklausys nuo bendro gryninimo priemonių (susijusių su audinio tipu) turinio ir tipo, eliuavimo tūrio ir laikymo sąlygų. Naudotojams rekomenduojame nustatyti eliuato stabilumą pagal jų konkrečius poreikius.

Jei rinkinys naudojamas kartu su QIAGEN pasrovinio pritaikymo procedūromis, vadovaukitės atitinkamo rinkinio vadovo instrukcijomis. Pavyzdinis stabilumo patikrinimo tyrimas parodė, kad DNR, išskirta iš FFPE audinių mėginių, yra tinkama naudoti su „*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit“, kai laikoma iki 7 dienų 4 °C temperatūroje ir papildomai laikoma –20 °C temperatūroje iš viso iki penkių savaičių, naudojant kelis užšaldymo / atitirpinimo ciklus.

Simboliai

Šiame dokumente naudojami toliau nurodyti simboliai. Viso simbolių, naudojamų naudojimo instrukcijose arba pakuotėje ir ženklime, sąrašo ieškokite vadove.

Simbolis	Simbolio apibrėžimas
	Šis gaminys atitinka Europos Reglamento 2017/746 dėl <i>in vitro</i> diagnostikos medicinos priemonių reikalavimus.
	<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos priemonė
	Katalogo numeris
Rn	R yra naudojimo instrukcijų peržiūrėtas leidimas, n yra peržiūrėto leidimo numeris
	Gamintojas

Peržiūros istorija

Peržiūrėtas leidimas

R1, 2022 m. birželis

Aprašas

2 versija, 1 peržiūra

- Atnaujinkite į 2 versiją, kad ji atitiktų IVDR reikalavimus
- Pridėti skyriai „Trukdančios medžiagos“, „Kryžminė tarša“, „Eliuato stabilumas“ ir „Suderinamumas su pasrovinio pritaikymo procedūromis“

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų gaminių garantinių įsipareigojimų ribojimą pateikta atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove arba naudotojo vadove. QIAGEN rinkinių vadovai ir naudotojo vadovai pateikiami svetainėje www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninės priežiūros skyriaus ar vietinio platintojo.

Prekių ženklai: QIAGEN®, „Sample to Insight®“, „QIAamp®“, „Pyrosequencing®“, „QuantiTect®“, „Rotor-Gene®“, „therascreen®“ (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Šiame dokumente vartojami registruotieji pavadinimai, prekių ženklai ir kt., net jeigu jie nėra specialiai pažymėti, vis tiek saugomi įstatymų.

06/2022 HB-3033-D01-001 © QIAGEN, 2022 m. Visos teisės saugomos.

