




Charakterystyka działania zestawu

Zestaw QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue, wersja 1 **REF** 60404

Zarządzanie wersjami

Niniejszy dokument to charakterystyka działania zestawu: zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue, wersja 1, R3.

 		Przed wykonaniem testu należy sprawdzić, czy na stronie www.qiagen.com/HB-0414 są dostępne nowe wydania dokumentacji w formie elektronicznej. Aktualność wydania można określić po dacie (format: miesiąc/rok).
---	---	---

Dalsza analiza

Wyluowany genomowy DNA jest gotowy do wykorzystania w różnych dalszych testach, w tym w wielu dalszych testach diagnostycznych in vitro. Więcej informacji o działaniu określonego systemu można znaleźć w instrukcji obsługi odpowiedniego zestawu QIAGEN.

Uzysk oczyszczonego DNA

Próbki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) mogą wykazywać wysoki stopień niejednorodności tkanek. Ponadto w próbkach FFPE występuje duża zmienność pola powierzchni tkanki, co przekłada się na różnice w ilości wyekstrahowanego DNA. Dlatego użytkownik powinien zoptymalizować liczbę, grubość i pole powierzchni skrawków z uwzględnieniem oczekiwanej wielkości próbki i procedur używanych w swoim laboratorium.

Jeśli zestaw używany jest razem z produktem QIAGEN do dalszej analizy, należy zapoznać się z informacjami zamieszczonymi w odpowiedniej instrukcji obsługi.

Niedostateczne odwodnienie tkanki podczas przygotowywania skrawków tkankowych FFPE, umieszczenie zbyt dużej ilości parafiny razem z próbką w próbówce do ekstrakcji, stosowanie etanolu o stopniu oczyszczenia niższym od zalecanego (nieprzeznaczonego do stosowania w

biologii molekularnej) lub pozostawienie ksylenu bądź etanolu w próbce może doprowadzić do nieoptymalnego przebiegu ekstrakcji i uzyskania małej ilości DNA.

Powtarzalność

Powtarzalność oceniano przy użyciu preparatów FFPE sześciu linii komórkowych uzyskanych z komórek ludzkich utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Próbkę testowano przy użyciu mieszaniny mastermix QuantiTect® SYBR® Green i primerów specyficznych dla genu β -aktyny w aparacie Rotor-Gene® Q do łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction, PCR) w czasie rzeczywistym. Reakcje PCR przeprowadzono dla dwóch fragmentów ludzkiego genu β -aktyny: o wielkości 174 bp i 218 bp.

Do analizy statystycznej wykorzystano po 72 punkty danych z każdego fragmentu. Analiza statystyczna obejmowała obliczenie odchylenia standardowego (standard deviation, SD) oraz górnej i dolnej granicy 95-procentowego przedziału ufności. Zmienność oszacowano przy użyciu analizy składowych wariancji jako odchylenie standardowe dla fragmentu o wielkości 218 bp (SD: 0,342 C_T ; dolna granica 95-procentowego przedziału ufności: 0,291; górna granica 95-procentowego przedziału ufności: 0,413). Wartość tę można wykorzystać jako oszacowanie powtarzalności procesu ekstrakcji. Zmienność oszacowana dla fragmentu o wielkości 174 bp wyniosła 0,258 C_T ; dolna granica 95-procentowego przedziału ufności: 0,220; górna granica 95-procentowego przedziału ufności: 0,312.

Odtwarzalność

Ocenę odtwarzalności przeprowadzono w trzech laboratoriach przy użyciu trzech klinicznych próbek FFPE zawierających tkankę niedrobnokomórkowego raka płuca (non-small cell lung cancer, NSCLC): jednej próbki z delecją 6223, jednej próbki z mutacją L858R i jednej próbki preparatu typu dzikiego (wild-type, WT). Kliniczne próbki FFPE wybierano na podstawie ich znanego statusu mutacji określonego metodą Sanger.

Dla każdej ze zmutowanych próbek FFPE spośród 48 kolejnych skrawków FFPE wybrano losowo pary do wykorzystania w ekstrakcji, a następnie pary te podzielono na trzy partie, po jednej na każdy ośrodek biorący udział w teście.

W każdym ośrodku przeprowadzono ekstrakcje w duplikatach. Każdy ośrodek korzystał przy ekstrakcji z jednej, unikatowej partii zestawu QIAamp FFPE DNA DSP. Oceny próbek i mutacji we wszystkich trzech ośrodkach dokonano przy użyciu zestawu *therascreen* EGFR RGQ PCR. Próbkę testowano w trzech nienastępujących po sobie dniach w okresie sześciu dni. Każdą próbkę testowano sześć razy w każdym ośrodku, uzyskując łącznie 18 punktów danych z każdej próbki.

We wszystkich próbkach i wszystkich trzech ośrodkach w 100% prawidłowo wykryto mutacje.

Liniowość

Zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue może być używany do izolowania DNA z różnych typów tkanek. Należy wyznaczyć zakres liniowości zgodnie z wymaganiami klienta i poddać go procesowi walidacji w konkretnym zastosowaniu. Dla różnych typów tkanek oczekuje się różnych zakresów liniowości, w zależności od ilości tkanki analizowanej w systemie i jej charakterystyki.

Substancje zakłócające

Zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue może być używany do izolowania DNA z różnych typów tkanek. Substancje potencjalnie zakłócające mogą pochodzić z różnych źródeł, np. mogą to być naturalne metabolity charakterystyczne dla typu tkanki i narządu, metabolity wytwarzane w stanach patologicznych, substancje wprowadzone w toku leczenia pacjenta lub substancje spożyte przez pacjenta. Ze względu na złożoność substancji potencjalnie zakłócających i różnice w czułości dalszych testów zalecamy, by użytkownicy oceniali wpływ substancji zakłócających w swoich własnych systemach i poddali procesowi walidacji metodę ograniczania zakłóceń w konkretnym dalszym zastosowaniu diagnostycznym.

Więcej informacji na temat substancji zakłócających w konkretnych dalszych zastosowaniach produktów QIAGEN można znaleźć w instrukcjach obsługi odpowiednich zestawów.

Zanieczyszczenie krzyżowe

Do oceny zanieczyszczenia krzyżowego użyto dwóch próbek FFPE linii komórkowej raka NSCLC: typu dzikiego i próbki FFPE linii komórkowej zawierającej mutację L858R w eksonie 21. W badaniu próbowano zasymulować sytuację, w której próbki o wysokim poziomie mutacji mogłyby zanieczyścić krzyżowo inne próbki podczas procedury ekstrakcji. Aby stworzyć potencjalne warunki do zanieczyszczenia, przy użyciu jednej partii odczynników przeprowadzono oczyszczenie DNA z próbek z mutacją L858R umieszczonych obok próbek typu dzikiego. Zanieczyszczenie krzyżowe oceniano przy użyciu zestawu *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR. Wyniki wykazały, że w całym systemie nie doszło do zanieczyszczenia krzyżowego.

Charakterystyka zachowania eluatu DNA uzyskanego przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA FFPE w procedurze Pyrosequencing®

DNA wyizolowany z preparatów tkankowych FFPE rozcieńczono do stężenia DNA 2 ng/μl i poddano analizie testem *therascreen* EGFR Pyro Assay. We wszystkich testach, na podstawie których wyznaczano charakterystykę zachowania, sygnał przekraczał 30 względnych jednostek świetlnych (relative light units, RLU) dla wszystkich kodonów, a ze wszystkich próbek uzyskano prawidłowy wynik medyczny analizy mutacji.

Stabilność eluatu

Stabilność eluatu zależy będzie od ilości i rodzaju zanieczyszczeń pozostałych po wymyciu (w odniesieniu do typu tkanki), objętości wymywania i warunków przechowywania. Zalecamy, aby użytkownicy określili stabilność eluatu w warunkach zgodnych z własnymi wymaganiami.

Jeśli opisywany tutaj zestaw używany jest razem z produktem QIAGEN do dalszej analizy, należy zapoznać się z informacjami zamieszczonymi w instrukcji obsługi odpowiedniego zestawu.

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

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QuantiTect®, Pyrosequencing®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (grupa QIAGEN); SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc).

© 2017 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone. 02/2017 HB-0414-D01

