

# QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit

## Käyttöohjeet (suorituskykyominaisuudet)

Versio 2



In vitro -diagnostiseen käyttöön

Käytettäväksi QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjan kanssa.



REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Saksa

R1

Suorituskykyominaisuudet ovat saatavilla sähköisesti, ja ne voi ladata tuotesivun materiaalivälilehdestä osoitteessa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Johdanto

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit on järjestelmä, jossa käytetään piioksidikalvotekniikkaa (QIAamp-tekniikkaa) genomisen DNA:n eristämiseen ja puhdistamiseen formaliini-fiksoiduista parafiiniin valetuista (FFPE) biologisista näytteistä.

Tuote on tarkoitettu näytteiden valmisteluun käsin, eikä se tuota laadullisia tai laskennallisia tutkimustuloksia.

# Suorituskykyominaisuudet

Huomautus: Suorituskykyominaisuudet riippuvat paljolti useista tekijöistä ja liittyvät tiettyyn myöhempään käyttösovellukseen. Ne on määritetty QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjalle yhdessä esimerkkinä käytettävien FFPE-valettujen kudostyyppien ja esimerkkinä käytettävien myöhempien käyttökohteiden kanssa. Nukleiinihappojen eristämismenetelmiä käytetään kuitenkin yhdessä erilaisten biologisten näytteiden kanssa sekä ensimmäisenä vaiheena ennen käsittelyä erilaisissa myöhemmissä sovelluksissa. Suorituskykyparametrit, kuten ristikontaminaatio tai ajon toistettavuus ja uusittavuus, on määritettävä sellaiselle työnkululle osana myöhempää käyttösovelluksen kehitystä. Siksi on käyttäjän vastuulla validoida koko työnkulku ja määrittää sopivat suorituskykyparametrit.

## Perussuorituskyky ja yhteensopivuus erilaisten myöhempien käyttösovellusten kanssa

### Myöhemmät analyysit

Eluoitu genominen DNA on valmis käytettäväksi erilaisissa myöhemmissä määrittämissä, myös useissa eri diagnostisissa in vitro-määrittämissä. Katso soveltuvan QIAGEN®-sarjan käsikirjasta lisätietoja järjestelmän tarkoista suoritusarvoista.

### Puhdistetun DNA:n tuotto

Formaliini-fiksoiduissa, parafiinivaletuissa (FFPE) näytteissä voi olla erittäin paljon kudoksen heterogeenisyyttä. Lisäksi kudosten pinta-alat vaihtelevat suuresti FFPE-näytteissä, jolloin myös näytteestä uutetun DNA:n määrä ja laatu vaihtelee. Jotta tiettyyn myöhempään sovellukseen saadaan soveltuvan määrän riittävän laadukasta DNA:ta, käyttäjän on itse määritettävä sopivin palojen määrä, paksuus ja palojen pinnan pinta-ala näytteen luonteen mukaan ja kaikkiin laboratorioissa käytettäviin menetelmiin.

Jos pakkauksia käytetään myöhemmin yhdessä QIAGEN-sovellusten kanssa, katso ohjeita soveltuvan sovelluksen käyttöohjeesta.

Riittämätön kudoksen kuivaus FFPE-kudoksen valmistelun aikana, liian parafiinin joutuminen näytteen mukana eristysputkeen, suositeltua epäpuhtaamman etanolin (muun kuin molekyylibiologiaan sopivan tasoisen etanolin) käyttö tai ksyleenin tai etanolin jääminen näytteeseen voi johtaa puutteelliseen uuttumiseen, DNA:n pieneen määrään tai DNA:n heikkoon laatuun.

### Toistettavuus

Toistettavuus on arvioitu käyttämällä kuutta FFPE-solulinjaa, jotka luotiin formaliini-fiksoiduista ja parafiinivaletuista ihmissoluista. Näytteet testattiin samanaikaisesti QuantiTect® SYBR® Green master mix -seoksella ja  $\beta$ -aktiinin geenispesifisillä alukkeilla Rotor-Gene® Q real time PCR -laitteessa. PCR-reaktiot tehtiin 174 bp:n kappaleelle ja 218 bp:n kappaleelle ihmisen  $\beta$ -aktiinigeeniä.

Tilastolliseen analyysiin käytettiin 72 tietopistettä molemmista kappaleista. Tilastolliseen analyysiin kuului keskihajonnan (SD) sekä ylemmän ja alemman 95 %:n luottamusrajan laskenta. Vaihtelu arvioitiin käyttämällä varianssikomponenttianalyysia 218 bp:n kappaleen keskihajontana (SD: 0,342 CT, alempi 95 %:n luottamusraja: 0,291; ylempi 95 %:n luottamusraja: 0,413). Tätä voidaan käyttää arviona eristysprosessin toistettavuudelle. 174 bp:n kappaleelle arvioitu variaatio oli 0,258 CT; alempi 95 %:n luottamusraja: 0,220; ylempi 95 %:n luottamusraja: 0,312.

## Uusittavuus

Uusittavuus arvioitiin kolmessa laboratoriossa käyttämällä kolmea kliinistä FFPE-näytettä, jotka sisälsivät ei-pienisoluisen keuhkosyövän (NSCLC) kudosta: yhdessä oli 6223-deleetio-mutaatio, yhdessä oli L858R-mutaatio ja yksi oli villityypin (WT) näyte. Kliiniset FFPE-näytteet valittiin Sanger-sekvensoinnin mukaan näytteiden tunnetun mutaatiostatuksen perusteella.

Jokaisesta mutatoituneesta kliinisestä FFPE-näytteestä satunnaistettiin 48 peräkkäistä FFPE-osaa pareiksi, joita käytettiin uuttamisessa ja jotka jaettiin kolmeen erään. Erät lähetettiin eri laboratorioihin.

Uuttaminen tehtiin kaksoiskappaleina kaikissa tutkimuslaitoksissa. Jokaisessa laitoksessa toimenpiteen tekoon käytettiin omaa QIAamp FFPE DNA DSP Kit -sarjan erää. Näytteiden arviointi ja mutaation arviointi tehtiin käyttämällä *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit -sarjaa kaikissa kolmessa tutkimuslaitoksessa. Näytteet testattiin kolmen ei-peräkkäisenä päivänä kuuden päivän aikana. Jokainen näyte testattiin kuusi kertaa jokaisessa tutkimuslaitoksessa, jolloin saatiin 18 tietopistettä näytettä kohti.

Kaikissa näytteissä ja kaikissa kolmessa tutkimuslaitoksessa todettiin 100-prosenttisesti oikea mutaatio.

## Lineaarisuus

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -pakkausta voidaan käyttää DNA:n uuttamiseen erilaisista kudostyypeistä. Lineaarinen valikoima on muodostettava asiakkaan vaatimusten mukaan ja validoitava laitoskohtaisesti. Erilaisia lineaarisia valikoimia odotetaan erilaisista kudostyypeistä, järjestelmään asetetun kudosmäärän mukaisesti, sekä erilaisista kudosominaisuuksista.

## Häiritsevät aineet

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -pakkausta voidaan käyttää DNA:n uuttamiseen erilaisista kudostyypeistä. Mahdolliset häiritsevät aineet voivat olla peräisin eri lähteistä, esim. kudostyypille tai elimelle tyypilliset luonnolliset metaboliitit, patologisten tilojen aiheuttamat metaboliitit, potilaan hoidon aikana käytetyt aineet tai potilaan ravinnon mukana sulattamat aineet.

Häiritsevien aineiden testauksessa näytteen valmistelussa käytettiin QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjaa ja esimerkkinä käytettyjä myöhempiä sovelluksia, joiden avulla arvioitiin uutettujen nukleiinihappojen laatu. Esimerkkejä testatuista diagnostisista QIAGEN-sarjoista on lueteltu kohdassa Taulukko 1.

Myöhempien sovellusten puhtausvaatimukset voivat olla kuitenkin erilaisia (esim. ei lainkaan häiritseviä aineita), samoin kuin erilaisissa näytteissä sallittavat häiritsevät aineet voivat olla erilaisia. Siksi soveltuvien häiritsevien aineiden tunnistus-, testaus- ja valvontatoimenpiteet on määritettävä osaksi sellaisia diagnostisia työnkuluja, joissa käytetään QIAamp DSP FFPE Tissue Kit -sarjaa ja jotakin myöhempiä sovellusta.

Taulukko 1. Myöhempiä määrittämiä häiritsevien aineiden tutkimus

Diagnostinen sarja	Testatut häiritsevät aineet	Päätelmät
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Parafiinivaha Ksyleeni Etanoli Buffer ATL -puskuri Proteinase K (Proteinaasi K) Buffer AL -puskuri Buffer AW1 -puskuri Buffer AW2 -puskuri Hemoglobiini	Viiteen mutaation sisältävään näytteeseen (joista jokainen edusti yhtä PIK3CA-sarjan määrittämiä) ja yhteen villityypin näytteeseen lisättiin yhdeksää mahdollisesti häiritsevää ainetta ja näistä näytteistä testattiin aineiden vaikutus $\Delta C_t$ -keskiarvoon ja mutaation tunnistamiseen.  Tämän tutkimuksen tiedot osoittavat, että testatut häiritsevät aineet eivät vaikuttaneet mutaation sisältävään tai villityypin näytteisiin käytetyillä häiritsevän aineen pitoisuuksilla. Jos havaittiin merkittävä ero, se oli alle kolminkertainen määrittämisen väliarvokaudesta ja näin ollen se oli määrittämisen luontaisen vaihtelun mukainen.  Kaikki havainnot mutaatioista sekä mutaatio- että villityypinäytteissä olivat odotusten mukaisia. Tämän tutkimuksen tiedot osoittavat, että tutkimus täytti hyväksymiskriteerit.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Parafiinivaha Ksyleeni Etanoli Buffer ATL -puskuri Proteinase K (Proteinaasi K) Buffer AL -puskuri Buffer AW1 -puskuri Buffer AW2 -puskuri	Tämä tutkimus suunniteltiin arvioimaan mahdollisten häiritsevien aineiden vaikutuksia KRAS-sarjan suorituskykyyn.  Mutaation sisältävien näytteiden osalta tavoite oli todentaa, että häiritseviä aineita sisältävien näytteiden keskimääräiset määrittämiskertoimet eivät eronneet merkittävästi niiden näytteiden arvoista, joissa ei ollut häiritseviä aineita. Villityypinäytteiden osalta tavoitteena oli osoittaa, että näytteessä olevan häiritsevän aineen ei pitäisi aiheuttaa virheellisesti positiivisia tuloksia.  Havaittiin kaksi määrittämisen / häiritsevän aineen yhdistelmää, jotka aiheuttivat virheellisesti positiivisen tuloksen. Molemmat tapaukset liittyivät matalaan ksyleenipitoisuuteen eikä niihin liittynyt vertailukelpoisia virheellisesti positiivisia tuloksia näytteissä, joissa pitoisuus oli suuri.  Molemmat tavoitteet saavutettiin, mikä vahvisti hypoteesin, että mikään QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjan aine ei normaalikäytössä olevilla pitoisuuksilla häiritse KRAS-sarjan kykyä erottaa mutaatiopositiiviset ja mutaationegatiiviset näytteet.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Parafiinivaha Ksyleeni Etanoli Buffer ATL -puskuri Proteinase K (Proteinaasi K) Buffer AW1 -puskuri Buffer AW2 -puskuri	Tämän tutkimuksen tavoite oli todentaa uutto-prosessissa käytettyjen mahdollisten häiritsevien aineiden vaikutus <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) -sarjan suorituskykyyn, kun sitä käytetään QIAGEN Rotor-Gene Q MDx -alustalla (RGQ).  Tähän tutkimukseen valittiin kahdeksan FFPE-vakionäytettä, jotka edustivat kutakin seitsemästä EGFR-mutaatiomäärittämisestä sekä yhtä villityyppiä (WT).  Arvioidut erot $\Delta C_t$ -keskiarvoissa mutaation sisältävälle FFPE-vakionäytteelle häiritsevän aineen molemmille pitoisuuksille ja tyhjille replikaateille eivät joko eronneet merkittävästi nolasta tai niitä pidettiin pieninä, sillä arvo oli alle 1 Ct.  Sarja havaitsi mutaation kaikissa mutaation sisältävissä näytteissä, jotka sisälsivät erikseen kaikkia häiritseviä aineita erikseen matalana tai korkeana pitoisuutena. Sarja ei tunnistanut mutaatiota mistään villityypin replikaatista, jotka sisälsivät erikseen kaikkia häiritseviä aineita erikseen matalana tai korkeana pitoisuutena.  Tutkimus vahvisti, että FFPE-uuttosarjassa käytetyt reagenssit eivät vaikuta EGFR Kit -sarjan suorituskykyyn.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Parafiinivaha Ksyleeni Etanoli Buffer ATL -puskuri Buffer AL -puskuri Buffer AW1 -puskuri Buffer AW2 -puskuri Buffer ATE -puskuri	Tutkimus suunniteltiin osoittamaan, että (QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE Extraction Kit) -sarjasta peräisin olevan) mahdollisesti häiritsevän aineen läsnäolo ei tuota virheellisesti positiivisia tai virheellisesti negatiivisia tuloksia KRAS System NSCLC -sarjalle eli vaikuta mutaation tunnistamiseen tai saa järjestelmää hylkäämään näytettä varmuuden vuoksi.  DNA:n uutto-prosessista tunnistettiin kahdeksan mahdollisesti häiritsevää ainetta. Jokainen aine testattiin kahdeksassa FFPE-solulinjassa, jotka edustivat kutakin KRAS Kit NSCLC Kit -sarjan havaitsemista seitsemästä mutaatiosta sekä villityypin näytettä. Mutaationäytteet testattiin tasolla, joka vastasi noin kolminkertaista havaitsemisrajaa (3 x LOD).  Tutkimus osoitti, että testatuilla aineilla ei ollut haitallista vaikutusta määrittämisen suorituskykyyn yksinkertaisella häiriötasolla: mutaatio havaittiin aina oikein, eikä häiritsevän aineen läsnäolo aiheuttanut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta $\Delta C_t$ -eroon suurimmassa osassa testattuja näytetilanteista (testattiin 58/64 näytetilannetta yksinkertaisella tasolla). Kuudessa näytteessä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero ja näissäkin havaittu ero kussakin näytteessä oli tutkimuksen hyväksyntärajassa eli $\pm 2$ SD (arvioitu SD eli keskihajonta luotiin toistettavuuden ja uusittavuuden raportin pohjalta).  Tutkimus osoitti myös, että määrittäminen sietää kaikkia aineita odotettua suurempia määriä, eli oikea mutaatio havaittiin, vaikka häiritsevää ainetta oli näytteessä 10-kertaisesti suurin odotettu pitoisuus.

Katso myöhemmissä sovelluksissa käytettävien QIAGEN-sarjojen omista käsikirjoista lisätietoja.

## Ristikontaminaatio

Ristikontaminaation tason arvioimiseen käytettiin kahta FFPE-solulinjan NSCLC-näytettä: WT-näyte ja FFPE-solulinjanäyte, jossa oli eksonin 21 L858R-mutaatio. Tutkimuksessa pyrittiin matkimaan tilannetta, jossa korkean pitoisuuden mutaatiota sisältävät näytteen voivat ristikontaminoida muut näytteet uuttamistoimenpiteen aikana. DNA:n puhdistus tehtiin haastamaan toimenpide puhdistamalla villityypin näytteiden viereen asetettujen L858R-mutatoituneiden näytteiden DNA. Puhdistuksessa käytettiin yhtä reagenssierää. Ristikontaminaatio arvioinnissa käytettiin *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjaa. Tuloksissa ei näkynyt ristikontaminaatiota koko järjestelmässä.

## QIAamp DSP DNA FFPE DNA -eluaatin suorituskyky Pyrosequencing®-määrittelyissä ja qPCR-pohjaisissa määrittelyissä

FFPE-kudoksesta eristetty DNA liuotettiin DNA-pitoisuuteen 2 ng/μl *therascreen* EGFR Pyro -määrittelyä varten. Kaikilla suorituskyvyn ominaisuuksien testauskerroilla signaali oli yli 30 RLU (suhteelliset valoyksiköt) kaikille kodoneille ja kaikkien näytteiden lääketieteellinen tulos oli oikean mutaatioanalyysissa.

Kolorektaalisyöpää, ei-pienisoluista keuhkosityöpää ja rintasyöpää sairastavien potilaiden FFPE-kudoksista eristettyä DNA:ta käytettiin suoraan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit-, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-, KRAS RGQ PCR NSCLC Kit- ja *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit -sarjoissa. QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -pakkauksella uutetun DNA:n C<sub>t</sub>-arvot olivat kullekin määrittelylle määriteltujen ja vastaavissa käsikirjoissa yksityiskohtaisesti määriteltujen työskentelyalueiden sisällä.





## Eluaatin vakaus

Eluaatin vakauteen vaikuttavat (kudostyyppiin liittyvät) yhteispuhdistettujen epäpuhtauksien sisältö ja tyyppi, eluutitilavuudet ja säilytysolosuhteet. Suosittelemme, että käyttäjä määrittää eluaatin vakauden tarpeidensa mukaan.

Jos pakkauksia käytetään myöhemmin yhdessä QIAGEN-sovellusten kanssa, katso ohjeita soveltuvan pakkauksen käyttöohjeesta. Esimerkkiluontoinen vakauden todennustutkimus on osoittanut, että FFPE-kudosnäytteistä eristetty DNA soveltuu käytettäväksi *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit -sarjan kanssa, kun DNA:ta säilytetään korkeintaan 7 vuorokauden ajan 4 °C:ssa ja lisäksi -20 °C:ssa yhteensä korkeintaan viiden viikon ajan, kun säilytyksen aikana tehdään useita pakastus-/sulatuskertoja.

## Merkinnät

Tässä asiakirjassa käytetään seuraavia symboleja. Täydellinen luettelo käyttöohjeissa tai pakkauksessa ja merkinnöissä käytetyistä symboleista on käsikirjassa.

Symboli	Selitys
	Tämä tuote täyttää in vitro -diagnostisia lääketieteellisiä laitteita koskevan eurooppalaisen säännöksen 2017/746 vaatimukset.
	In vitro -diagnostinen lääketieteellinen laite
	Tuotenumero
Rn	R tarkoittaa käyttöohjeiden versiota ja n on versionumero
	Valmistaja

## Muutoshistoria

Versio	Kuvaus
R1, kesäkuu 2022	Versio 2, versio 1 <ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="619 402 1107 425">• Päivitys versioon 2 IVDR-noudatusta varten</li><li data-bbox="619 449 1321 508">• Osiot Häiritsevät aineet, Ristikontaminaatio, Eluaatin vakaus ja Yhteensopivuus myöhempien käyttösovellusten kanssa lisättiin</li></ul>

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisissa QIAGEN-sarjojen käyttöoppaissa tai käsikirjoissa. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, theascreen® (QIAGEN-konserni); SYBR® (Life Technologies Corporation). Tässä asiakirjassa käytettyjä rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne., vaikka niitä ei ole erityisesti merkitty sellaisiksi, ei pidetä lain suojaamattomina.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.



