

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

Gebrauchsanweisung (Leistungsmerkmale)

Version 2



In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Deutschland

R1

Die Leistungsmerkmale sind elektronisch unter der Registerkarte „Resources“ (Ressourcen) auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar.

Allgemeine Einführung

Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ist ein System zur Isolierung und Aufreinigung genomischer DNA aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) biologischen Proben auf Grundlage der Silicamembrantechnologie (QIAamp-Technologie).

Es ist zur manuellen Probenvorbereitung vorgesehen und liefert weder qualitative noch quantitative Testergebnisse.

Leistungsmerkmale

Hinweis: Die Leistungsmerkmale sind stark von verschiedenen Faktoren abhängig und mit der spezifischen nachgelagerten Anwendung verbunden. Sie wurden für das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit in Verbindung mit beispielhaften in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Gewebetypen und beispielhaften nachgelagerten Anwendungen etabliert. Die Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren werden jedoch in Verbindung mit verschiedenen biologischen Proben und als Einstiegspunkt bei der Entwicklung zahlreicher nachgelagerter Anwendungen verwendet. Leistungsparameter wie Kreuzkontaminationen oder Lauf-Wiederholbarkeit und -Reproduzierbarkeit müssen für jeden derartigen Arbeitsablauf im Rahmen der Entwicklung der nachgelagerten Anwendung ermittelt werden. Aus diesem Grund liegt es in der Verantwortung des Anwenders, den gesamten Arbeitsablauf zu validieren, um geeignete Leistungsparameter zu etablieren.

Grundlegende Leistung und Kompatibilität mit verschiedenen nachgelagerten Anwendungen

Nachgelagerte Analysen

Eluierte genomische DNA kann für verschiedene nachgelagerte Assays verwendet werden, einschließlich für verschiedene nachgelagerte In-vitro-Diagnostikassays. Weitere Informationen über die Leistung des jeweiligen Systems finden Sie im Handbuch für das jeweilige QIAGEN® Kit.

Ausbeute an aufgereinigter DNA

Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Proben können eine beträchtliche Gewebeheterogenität aufweisen. Darüber hinaus schwankt die Gewebeoberfläche bei in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Proben erheblich, was zu Variabilität hinsichtlich der Menge und Qualität der extrahierten DNA führt. Aus diesem Grund sollte der Anwender die Anzahl der Schnitte, die Schnittdicke und die Schnittoberfläche für die jeweils relevante Probe und die im jeweiligen Labor durchgeführten Verfahren optimieren, um DNA in einer für die spezifischen nachgelagerten Anwendungen geeigneten Menge und Qualität zu erhalten.

Wird das Kit in Verbindung mit einer nachgelagerten Anwendung von QIAGEN verwendet, sind die Anweisungen in dem entsprechenden Handbuch zu beachten.

Eine unzureichende Dehydrierung des Gewebes im Rahmen der Vorbereitung des in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Gewebes, ein zu hoher Paraffingehalt in der in das Extraktionsröhrchen gegebenen Probe, die Verwendung von Ethanol, das nicht den empfohlenen Reinheitsgrad aufweist (keine für die Molekularbiologie geeignete Qualität), oder das Vorhandensein von Xylen- oder Ethanolrückständen in der Probe kann zu einer suboptimalen Extraktion und einer geringen DNA-Menge und -Qualität führen.

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit wurde anhand von 6 FFPE-Zelllinien bewertet, die aus formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten humanen Zellen erzeugt worden waren. Die Proben wurden mit QuantiTect® SYBR® Green Master-Mix und für das β -Actin-Gen spezifischen Primern im Rotor-Gene® Q Real-time PCR-Thermocycler getestet. Die PCR-Reaktionen wurden für ein 174-bp-Fragment und ein 218-bp-Fragment des humanen β -Actin-Gens durchgeführt.

Für die statistische Auswertung wurden 72 Datenpunkte für jede Fragmentgröße herangezogen. Die statistische Analyse umfasste die Berechnung der Standardabweichung (Standard Deviation, SD) und der oberen und unteren 95%-Konfidenzgrenzen. Die Variation wurde mithilfe einer Varianzkomponentenanalyse als Standardabweichung für das 218-bp-Fragment (SD: 0,342 CT; untere 95%-Konfidenzgrenze: 0,291 CT; obere 95%-Konfidenzgrenze: 0,413) geschätzt. Dieser Wert kann als Schätzwert der Wiederholbarkeit des Extraktionsprozesses verwendet werden. Die geschätzte Variation für das 174-bp-Fragment lag bei 0,258 CT; untere 95%-Konfidenzgrenze: 0,220 CT; obere 95%-Konfidenzgrenze: 0,312.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde in drei Labors unter Verwendung von 3 klinischen in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Proben mit Gewebe aus nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) beurteilt: Eine Probe enthielt eine 6223-Deletionsmutation, eine Probe enthielt die Mutation L858R und eine Probe war eine Wildtyp-Probe. Die klinischen in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Proben wurden auf Grundlage ihres bekannten Mutationsstatus gemäß Sanger-Sequenzierung ausgewählt.

Von jeder klinischen in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Probe mit Mutation wurden 48 aufeinander folgende FFPE-Schnitte paarweise randomisiert, um extrahiert und dann in drei Chargen aufgeteilt zu werden, d. h. eine Charge je Teststandort.

An jedem Teststandort wurden die Extraktionen in Doppelbestimmung durchgeführt. Jeder Teststandort verwendete für die Extraktion QIAamp FFPE DNA DSP Kits aus jeweils derselben Charge. Proben- und Mutationsbewertung wurden an allen drei Teststandorten mit dem *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit durchgeführt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen an 3 nicht aufeinander folgenden Tagen getestet. An jedem Teststandort wurde jede Probe 6-mal getestet, sodass je Probe 18 Datenpunkte erhalten wurden.

Mit allen Proben und in allen drei Testlabors wurden die Mutationen zu 100 % korrekt nachgewiesen.

Linearität

Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kann für die Isolierung von DNA aus verschiedenen Gewebetypen verwendet werden. Der Kunde sollte seinen eigenen Anforderungen entsprechend einen linearen Bereich ermitteln und für den jeweiligen Gebrauch validieren. Es ist davon auszugehen, dass für verschiedene Gewebetypen je nach Gewebeeintrag in das System und je nach den Gewebeeigenschaften unterschiedliche lineare Bereiche erhalten werden.

Störsubstanzen

Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kann für die Isolierung von DNA aus verschiedenen Gewebetypen verwendet werden. Potenzielle Störsubstanzen können unterschiedlicher Herkunft sein, z. B. kann es sich dabei um natürliche Metaboliten handeln, die für den jeweiligen Gewebetyp und das jeweilige Organ spezifisch sind, um Metaboliten, die unter pathologischen Bedingungen gebildet werden, um Substanzen, die im Rahmen der Behandlung des Patienten zugeführt wurden, oder um Substanzen, die vom Patienten selbst aufgenommen wurden.

Tests auf Störsubstanzen wurden unter Verwendung des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit zur Probenvorbereitung in Verbindung mit beispielhaften nachgelagerten Anwendungen durchgeführt, um die Qualität der extrahierten Nukleinsäuren zu bewerten. Beispiele für die getesteten diagnostischen QIAGEN Kits sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Verschiedene nachgelagerte Anwendungen können jedoch unterschiedliche Anforderungen an die Reinheit (d. h. Abwesenheit potenzieller Störsubstanzen) stellen und die in der spezifischen Probe enthaltenen Störsubstanzen können vielfältig sein. Aus diesem Grund müssen für den jeweils spezifischen diagnostischen Arbeitsablauf mit dem QIAamp DSP FFPE Tissue Kit und die spezifische nachgelagerte Anwendung auch die Identifikation, das Testen und die Kontrolle relevanter Störsubstanzen etabliert werden.

Tabelle 1. Studie zu Störsubstanzen für nachgelagerte Assays

Diagnostik-Kit	Getestete Störsubstanzen	Schlussfolgerung
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit	Paraffinwachs Xylen Ethanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Hämoglobin	Fünf mutierte Proben (jeweils repräsentativ für einen der Assays im PIK3CA Kit) und eine Wildtyp-Probe wurden mit 9 potenziellen Störsubstanzen versetzt und auf deren Auswirkungen auf den mittleren ΔCt und das Mutationsergebnis getestet. Die Daten aus dieser Studie zeigen, dass die getesteten Störsubstanzen in den verwendeten Konzentrationen keine Auswirkungen auf die mutierten oder Wildtyp-Proben hatten. In den Fällen, in denen ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde, lag dieser innerhalb der 3-fachen Zwischenpräzision und damit innerhalb der inhärenten Variabilität des Assays. Alle Mutationsergebnisse für mutierte und Wildtyp-Proben entsprachen den Erwartungen. Die in dieser Studie beobachteten Daten zeigen, dass die Studie die Akzeptanzkriterien erfüllte.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Paraffinwachs Xylen Ethanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2	Diese Studie war darauf ausgelegt, die Auswirkungen potenzieller Störsubstanzen auf die Leistung des KRAS Kit zu beurteilen. Für mutierte Proben war das Ziel, zu demonstrieren, dass sich die mittleren Assaywerte für Proben mit einer Störsubstanz nicht signifikant von solchen ohne die Störsubstanz unterscheiden. Für Wildtyp-Proben war das Ziel, zu demonstrieren, dass das Vorliegen einer Störsubstanz nicht zu falsch positiven Ergebnissen führt. Es wurden zwei Kombinationen aus Assay und Störsubstanz ermittelt, die zu falsch positiven Ergebnissen führten. Beide wurden jedoch bei niedrigen Konzentrationen von Xylen erhalten, ohne dass vergleichbare falsch Positive bei den Proben mit höheren Konzentrationen aufgetreten wären. Es wurden beide Ziele erreicht, was die Hypothese bestätigte, dass keine Substanz aus dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit in den normalerweise verwendeten Konzentrationen die Fähigkeit des KRAS Kit zur Unterscheidung zwischen mutationspositiven und mutationsnegativen Proben stört.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit)	Paraffinwachs Xylen Ethanol Buffer ATL Proteinase K Buffer AW1 Buffer AW2	Das Ziel dieser Studie war die Verifizierung der Auswirkungen potenzieller Störsubstanzen, die im Extraktionsverfahren zum Einsatz kommen, auf die Leistung des <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) bei Verwendung auf der QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Plattform (RGQ). Acht in Paraffin eingebettete (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Standardproben, repräsentativ für die 7 EGFR-Mutationsassays sowie einen Wildtyp, wurden für diese Studie ausgewählt. Die geschätzten Unterschiede der mittleren ΔCt -Werte für jeden der mutierten FFPE-Standards zwischen den einzelnen Konzentrationen der Störsubstanzen und den „Leerproben“-Replikaten unterschieden sich entweder nicht signifikant von Null oder hatten einen geringen Wert von weniger als 1 Ct. Für alle mutierten Replikate lautete das Mutationsergebnis bei den niedrigen und hohen Konzentrationen der Störsubstanzen für alle Störsubstanzen „Mutation detected“ (Mutation nachgewiesen). Für alle Wildtyp-Replikate lautete der Probenmutationsstatus bei den niedrigen und hohen Konzentrationen der Störsubstanzen für alle Störsubstanzen „Mutation not detected“ (Mutation nicht nachgewiesen). Die Studie bestätigte, dass die im FFPE Extraction Kit verwendeten Reagenzien keine Auswirkungen auf die Leistung des EGFR Kit haben.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit	Paraffinwachs Xylen Ethanol Buffer ATL Buffer AL Buffer AW1 Buffer AW2 Buffer ATE	Die Studie wurde mit dem Ziel entwickelt, zu demonstrieren, dass die Anwesenheit einer potenziellen Störsubstanz (aus dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE Extraction Kit)) keine falsch positiven oder falsch negativen Ergebnisse für das KRAS System NSCLC Kit erzeugen würde, das Mutationsergebnis also nicht beeinträchtigt wäre und das System nicht dazu veranlassen würde, „zur Sicherheit“ einen ungünstigen Probenstatus auszugeben. Acht potenzielle Störsubstanzen aus dem DNA-Extraktionsprozess wurden identifiziert. Jede Substanz wurde gegen 8 FFPE-Zelllinien getestet, die jeweils eine der 7 durch das KRAS Kit NSCLC Kit nachgewiesenen Mutationen sowie eine Wildtyp-Probe repräsentierten. Die Mutationsproben wurden in einer etwa dem 3-Fachen der Nachweisgrenze ($3 \times LOD$) entsprechenden Konzentration getestet. Die Studie zeigte, dass die getesteten Substanzen bei 1-facher Konzentration der Störsubstanz keine negativen Auswirkungen auf die Leistung des Assays hatten; es wurde immer das korrekte Mutationsergebnis ausgegeben und das Vorliegen der Störsubstanz hatte bei der Mehrzahl der getesteten Probenbedingungen (58 von 64 Bedingungen bei 1-facher Konzentration) keinen statistisch signifikanten Effekt auf den Unterschied des ΔCt . Für die 6 Proben, die einen statistisch signifikanten Unterschied aufwiesen, lag der beobachtete Unterschied der Mittelwerte der einzelnen Proben innerhalb des Akzeptanzkriteriums der Studie von $\pm 2 \times SD$ (SD-Schätzwert dem Bericht zur Wiederholbarkeits- und Reproduzierbarkeitsstudie entnommen). Diese Studie zeigte auch, dass der Assay tolerant gegenüber höheren Konzentrationen der einzelnen Substanzen war, als sie bei einer Verschleppung zu erwarten wären, d. h. das korrekte Mutationsergebnis wurde ausgegeben, wenn die Störsubstanz in einer 10-fach höheren als der höchsten erwarteten Konzentration vorlag.

Bezüglich Informationen über Störsubstanzen in anschließend durchgeführten QIAGEN-Anwendungen sind die Handbücher der jeweiligen Kits zu beachten.

Kreuzkontaminationen

Zwei FFPE-Zelllinien-NSCLC-Proben wurden verwendet, um den Grad der Kreuzkontaminationen zu bewerten: Die Wildtyp-Probe und die FFPE-Zelllinienprobe mit der L858R-Mutation in Exon 21. Die Studie zielte darauf ab, die Situation nachzuahmen, in der Proben während der Extraktion unter Umständen mit anderen Proben mit hohem Mutationsgrad kreuzkontaminiert werden. Zur Überprüfung des Verfahrens wurde DNA aus Proben mit L858R-Mutation aufgereinigt, die neben Wildtyp-Proben standen. Es wurden Reagenzien jeweils derselben Charge verwendet. Kreuzkontaminationen wurden mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit geprüft. Die Ergebnisse zeigten im gesamten System keinerlei Kreuzkontaminationen.

Leistung des QIAamp DSP DNA FFPE DNA-Eluats bei Pyrosequencing® und qPCR-basierten Assays

Aus in Paraffin eingebettetem (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Gewebe isolierte DNA wurde auf eine DNA-Konzentration von 2 ng/µl verdünnt und für die Analyse mit dem *therascreen* EGFR Pyro Assay verwendet. In jedem Durchgang zur Ermittlung der Leistungsmerkmale lag das Signal für alle Codons bei über 30 RLU (Relative Light Units), und die Mutationsanalyse aller Proben lieferte ein korrektes medizinisches Ergebnis.

Aus in Paraffin eingebettetem (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Gewebe von Patienten mit Kolorektalkarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und Brustkrebs isolierte DNA wurde direkt im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, dem KRAS RGQ PCR NSCLC Kit und dem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit eingesetzt. Die Ct-Werte der unter Verwendung des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit extrahierten DNA lagen innerhalb der für jeden Assay definierten und in den entsprechenden Handbüchern angegebenen Arbeitsbereichsparameter.





Eluatstabilität

Die Eluatstabilität ist abhängig von Gehalt und Art der mit aufgereinigten Verunreinigungen (abhängig vom Gewebetyp), dem Elutionsvolumen und den Lagerungsbedingungen. Wir empfehlen, dass die Anwender die Eluatstabilität im Zusammenhang unter den jeweils vorliegenden Bedingungen selbst ermitteln.

Wird das Kit als Vorstufe für eine spätere QIAGEN-Anwendung verwendet, sind die Anweisungen in dem entsprechenden Kit-Handbuch zu beachten. Eine beispielhafte Studie zur Stabilitätsverifizierung zeigte, dass aus in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Gewebeproben extrahierte DNA sich zur Verwendung mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit eignet, wenn sie bis zu 7 Tage lang bei 4 °C mit zusätzlicher insgesamt bis zu fünfwöchiger Lagerung bei -20 °C mit mehreren Einfrier-/Auftauzyklen aufbewahrt wurde.

Symbole

Die folgenden Symbole werden in diesem Dokument verwendet. Eine vollständige Liste der in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Etikettierung verwendeten Symbole ist dem Handbuch zu entnehmen.

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der europäischen Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika.
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
Rn	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer
	Hersteller

Bearbeitungsverlauf

Revision	Beschreibung
R1, Juni 2022	Version 2, Revision 1 <ul style="list-style-type: none">• Aktualisierung auf Version 2 für Konformität mit IVDR• Abschnitte „Störsubstanzen“, „Kreuzkontaminationen“, „Eluatstabilität“ und „Kompatibilität mit nachgelagerten Anwendungen“ hinzugefügt

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit-Handbuch oder Benutzerhandbuch. QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Warenzeichen: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, *therascreen*® (QIAGEN Group); SYBR® (Life Technologies Corporation). Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

