

# Mode d'emploi (Caractéristiques de performances) du QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue Kit

Version 2



Pour utilisation diagnostique in vitro

Pour une utilisation avec le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Allemagne

R1

Les caractéristiques de performances sont disponibles au format électronique et se trouvent sous l'onglet Resource, sur la page du produit, à l'adresse [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Introduction générale

Le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit est un système ayant recours à la technologie des membranes de silice (technologie QIAamp) pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques fixés au formol et inclus en paraffine (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE).

Il permet de préparer des échantillons manuellement et ne donne pas de résultats de tests, qualitatifs ou quantitatifs.

# Caractéristiques de performances

Remarque : les caractéristiques de performances dépendent en grande partie de différents facteurs et sont liées à l'application spécifique en aval. Elles ont été établies pour le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit conjointement avec des types exemplaires de tissus inclus en paraffine (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) et des applications exemplaires en aval. Toutefois, les méthodes d'isolation des acides nucléiques sont utilisées conjointement avec différents spécimens biologiques et en première ligne pour de multiples applications en aval. Les paramètres de performance tels que la contamination croisée ou la répétabilité et la reproductibilité des cycles doivent être établis pour tout flux de travail de ce type dans le cadre du développement d'une application en aval. En conséquence, il incombe à l'utilisateur de valider l'ensemble du flux de travail afin d'établir les paramètres de performances appropriés.

## Performances de base et compatibilité avec différentes applications en aval

### Analyses en aval

L'ADN génomique élué est prêt à être utilisé pour différents tests en aval, y compris divers dosages de diagnostic in vitro en aval. Se reporter au manuel du kit QIAGEN® correspondant pour plus d'informations sur les performances spécifiques du système.

### Rendement en ADN purifié

Les échantillons de tissu fixé au formol et inclus en paraffine (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) peuvent présenter une grande hétérogénéité tissulaire. De plus, la surface tissulaire d'échantillons FFPE varie significativement, ce qui aboutit à des quantités et des qualités variables de l'ADN extrait. L'utilisateur devrait donc optimiser le nombre de sections, l'épaisseur et la superficie des sections pour l'échantillon qui l'intéresse et les éventuelles procédures utilisées dans son laboratoire pour obtenir une quantité et une qualité d'ADN adéquates pour les applications spécifiques en aval.

Si l'utilisation du kit est associée à une application QIAGEN en aval, se reporter aux instructions du manuel correspondant.

Une déshydratation insuffisante du tissu pendant la préparation du tissu FFPE, une quantité trop importante de paraffine placée avec l'échantillon dans le tube d'extraction, l'utilisation d'un éthanol de qualité inférieure (qualité autre que biologie moléculaire) à celle recommandée ou la présence résiduelle de xylène ou d'éthanol dans l'échantillon peut aboutir à une extraction sous-optimale et l'obtention d'une faible quantité et d'une qualité médiocre d'ADN.

### Répétabilité

La répétabilité a été évaluée au moyen de six lignées cellulaires FFPE générées à partir de cellules humaines fixées au formol et incluses en paraffine. Les échantillons ont été testés avec le mélange principal QuantiTect® SYBR® Green et des amorces spécifiques au gène  $\beta$ -actine avec le thermocycleur de Real-time PCR Rotor-Gene® Q. Des réactions PCR ont été réalisées pour amplifier deux fragments de 174 pb et 218 pb du gène  $\beta$ -actine humain.

Pour l'analyse statistique, 72 points de données ont été utilisés pour chaque taille de fragment. L'analyse statistique comprenait le calcul de l'écart-type (ET) et des limites supérieures et inférieures de l'intervalle de confiance à 95 %. La variation a été estimée par analyse des composantes de la variance comme l'écart-type pour le fragment de 218 pb (ET : 0,342 CT ; limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % : 0,291 ; limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % : 0,413). Cela peut être utilisé pour estimer la répétabilité de la procédure d'extraction. La variance estimée pour un fragment de 174 pb était de 0,258 CT ; limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % : 0,220 ; limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % : 0,312.

## Reproductibilité

La reproductibilité a été évaluée dans trois laboratoires à l'aide de trois échantillons FFPE cliniques contenant du tissu de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Un échantillon contenait une mutation de type délétion 6223 et un autre la mutation L858R. Le troisième échantillon contenait du tissu de type sauvage (wild type, WT). La sélection de ces échantillons FFPE cliniques a été réalisée sur la base de leur statut mutationnel connu déterminé par séquençage Sanger.

Pour chaque échantillon FFPE clinique comportant une mutation, 48 coupes consécutives de tissu FFPE ont été associées aléatoirement par paires pour être utilisées pour l'extraction, puis réparties en trois lots, un par site participant.

Les extractions ont été réalisées en double sur chaque site participant. Chaque site a utilisé un lot unique de kits QIAamp DNA DSP FFPE pour l'extraction. L'évaluation des échantillons et des mutations a été réalisée en utilisant le *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit sur les trois sites. Les échantillons ont été testés lors de trois jours non consécutifs sur une période de six jours. Chaque échantillon a été testé six fois sur chaque site de façon à obtenir un total de 18 points de données par échantillon.

Pour les trois sites et les trois échantillons, 100 % des mutations ont été identifiées correctement.

## Linéarité

Le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit peut être utilisé pour l'isolation de l'ADN issu de différents types de tissu. L'utilisateur doit établir une plage de linéarité selon ses besoins et la valider pour cette application. Il est attendu que les plages de linéarité varient d'un type de tissu à un autre, selon le tissu chargé dans le système et ses caractéristiques.

## Substances interférentes

Le QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit peut être utilisé pour l'isolation de l'ADN issu de différents types de tissu. Des substances potentiellement interférentes d'origines variées peuvent être présentes dans l'échantillon, par exemple des métabolites naturels spécifiques au type de tissu ou à l'organe, des métabolites générés lors d'un état pathologique, des substances liées au traitement du patient ou des substances ingérées par le patient.

Le test de substances interférentes a été réalisé à l'aide du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit pour la préparation des échantillons conjointement avec des applications exemplaires en aval pour une évaluation de la qualité des acides nucléiques extraits. Le Tableau 1 répertorie des exemples de kits de diagnostic QIAGEN testés.

Toutefois, différentes applications en aval peuvent avoir des exigences variables en termes de pureté (par ex. absence de substances interférentes potentielles) et les substances interférentes présentes dans l'échantillon spécifique peuvent être diverses. En conséquence, l'identification, le test et le contrôle des substances interférentes pertinentes doivent également être établis dans le cadre du flux de travail de diagnostic spécifique impliquant le kit QIAamp DSP FFPE Tissue et l'application spécifique en aval.

Tableau 1. Étude des substances interférentes du dosage en aval

| Kit de diagnostic                              | Substances interférentes testées   | Conclusion   |
|--|--|--|
| <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit          | Cire de paraffine<br>Xylène<br>Éthanol<br>Buffer ATL<br>Proteinase K<br>Buffer AL<br>Buffer AW1<br>Buffer AW2<br>Hémoglobine | Cinq échantillons mutants (chacun représentant l'un des dosages du kit PIK3CA) et un échantillon WT ont été complétés par 9 substances interférentes potentielles et testés en termes d'effet sur le $\Delta$ Ct moyen et l'appel de mutation.<br><br>Les données de cette étude indiquent que les substances interférentes testées n'ont eu aucun effet sur les échantillons de type mutant ou sauvage aux concentrations utilisées. Lorsqu'une différence significative était observée, elle se trouvait dans la plage de 3x la précision intermédiaire acceptable du dosage et était donc dans la plage de variabilité inhérente au dosage.<br><br>Toutes les mutations détectées dans les échantillons de type mutant et de type sauvage se sont avérées conformes à ce qui était attendu. Les données observées dans cette étude indiquent que l'étude répondait aux critères d'acceptation.  |
| <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit            | Cire de paraffine<br>Xylène<br>Éthanol<br>Buffer ATL<br>Proteinase K<br>Buffer AL<br>Buffer AW1<br>Buffer AW2                | Cette étude a été conçue pour évaluer les effets des substances interférentes potentielles sur la performance du kit KRAS.<br><br>Pour les échantillons mutants, l'objectif était de démontrer que les valeurs de dosage moyennes dans les échantillons contenant une substance interférente ne différaient pas beaucoup de celles qui étaient enregistrées sans la substance interférente. Pour les échantillons de type sauvage, l'objectif était de démontrer que la présence d'une substance interférente ne devrait pas provoquer de résultats faux positifs.<br><br>Deux combinaisons de dosage/substance interférente ont produit des résultats faux positifs. Toutefois, ils se situaient tous les deux dans le niveau bas du xylène, sans faux positif comparable dans les échantillons à haut niveau.<br><br>Ces deux objectifs ont été atteints, confirmant l'hypothèse selon laquelle aucune substance du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit aux concentrations présentes dans les conditions d'utilisation normales n'interfère avec l'aptitude du kit KRAS à distinguer les échantillons positifs à la mutation des échantillons négatifs à la mutation.   |
| <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (EGFR Kit) | Cire de paraffine<br>Xylène<br>Éthanol<br>Buffer ATL<br>Proteinase K<br>Buffer AW1<br>Buffer AW2                             | L'objectif de cette étude était de vérifier l'effet des substances interférentes potentielles utilisées dans le processus d'extraction sur la performance du <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (kit EGFR) utilisé sur la QIAGEN Rotor-Gene Q MDx platform (RGQ).<br><br>Huit échantillons standard de FFPE représentant chacun des 7 dosages de mutation EGFR plus un type sauvage (Wild-Type, WT) ont été choisis pour cette étude.<br><br>Les différences estimées des valeurs $\Delta$ Ct moyennes pour chacune des normes FFPE mutantes entre chacun des deux niveaux de substances interférentes et les réplicats « vierges » n'étaient pas significativement différentes de zéro ou étaient considérées comme mineures avec une valeur inférieure à 1 Ct.<br><br>Tous les réplicats mutants présentaient un appel de mutation détecté à chacun des niveaux d'interférents faibles et élevés pour toutes les substances interférentes. Tous les réplicats sauvages présentaient un statut de mutation non détecté à chacun des niveaux d'interférents faibles et élevés pour toutes les substances interférentes.<br><br>L'étude a confirmé que les réactifs utilisés dans le kit d'extraction FFPE n'affectent pas la performance du kit EGFR.   |
| <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR NSCLC Kit      | Cire de paraffine<br>Xylène<br>Éthanol<br>Buffer ATL<br>Buffer AL<br>Buffer AW1<br>Buffer AW2<br>Buffer ATE                  | L'étude a été conçue pour démontrer que la présence d'une substance potentiellement interférente (extraite du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, ou kit d'extraction FFPE) ne produirait pas de résultat faux positif ou faux négatif pour le kit NSCLC du système KRAS ; autrement dit, l'appel de mutation serait affecté ou déclencherait le mécanisme de « sécurité intégrée » du système en produisant un statut d'échantillon non valide.<br><br>Huit substances potentiellement interférentes issues du processus d'extraction de l'ADN ont été identifiées. Chaque substance a été testée par rapport à huit lignées cellulaires de FFPE, représentant chacune des 7 mutations détectées par le kit NSCLC du kit KRAS et un échantillon sauvage. Les échantillons mutants ont été testés à un niveau correspondant à environ trois fois la limite de détection (3 x LOD).<br><br>L'étude a démontré que les substances testées n'avaient aucun effet indésirable sur la performance du dosage au niveau 1x de substance interférente ; l'appel de mutation correct intervenait toujours et la présence de la substance interférente n'avait pas d'effet statistiquement significatif sur la différence de $\Delta$ Ct sur la majorité des conditions des échantillons testés (58 conditions sur 64, au niveau 1x). Pour les six échantillons qui n'ont pas présenté de différence statistiquement significative, la différence observée dans les moyennes de chaque échantillon se situait dans le critère d'acceptation de l'étude de $\pm 2 \times \text{É.T.}$ (estimation d'É.T. obtenue par le rapport d'étude de répétabilité et de reproductibilité).<br><br>L'étude a également démontré que le dosage était tolérant à niveaux de chacune des substances supérieurs à ceux des transferts attendus, c'est-à-dire que l'appel de mutation correct était produit lorsque la substance interférente était présente à 10x la concentration la plus forte attendue. |

Se reporter aux manuels des kits pour plus d'informations sur les substances interférentes pour des applications en aval QIAGEN spécifiques.

## Contamination croisée

Pour évaluer le niveau de contamination croisée, deux échantillons NSCLC de lignées cellulaires de FFPE ont été utilisés : Échantillon sauvage et échantillon de lignée cellulaire FFPE contenant la mutation d'exon 21 L858R. L'objectif de l'étude était de simuler une situation où des échantillons contenant une proportion élevée d'ADN muté pourraient contaminer de manière croisée d'autres échantillons traités lors de la même procédure d'extraction. Le procédé de purification de l'ADN a été mis à l'épreuve en purifiant des échantillons mutants L858R placés juste à côté d'échantillons sauvages, en utilisant le même lot de réactifs. La contamination croisée a été évaluée au moyen du *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Les résultats n'ont montré aucune contamination croisée dans l'ensemble du système.

## Performances de l'éluat du kit QIAamp DSP DNA FFPE pour les dosages de Pyrosequencing® et basés sur la PCRq

De l'ADN isolé à partir de tissu FFPE a été dilué jusqu'à obtenir une concentration en ADN de 2 ng/µl afin d'être analysé à l'aide du dosage *therascreen* EGFR Pyro. Dans toutes les séries utilisées pour la détermination des caractéristiques de performance, le signal était supérieur à 30 unités de lumière relatives (Relative Light Units, RLU) pour tous les codons, et les résultats médicaux de l'analyse mutationnelle étaient corrects pour tous les échantillons.

De l'ADN isolé dans le tissu FFPE de patients atteints de cancer colorectal, de cancer du poumon non à petites cellules et de cancer du sein a été utilisé directement dans le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, le *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, le kit KRAS RGQ PCR NSCLC et le *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Les valeurs Ct de l'ADN extrait à l'aide du QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit se situaient dans les paramètres de plage de fonctionnement définies pour chaque dosage et détaillés dans les manuels respectifs.





## Stabilité des éluats

La stabilité de l'éluat dépendra de sa teneur et du type d'impuretés co-purifiées (selon le type tissulaire), du volume d'élution et des conditions de conservation. Nous recommandons aux utilisateurs de déterminer la stabilité de l'éluat en fonction de leurs besoins particuliers.

Si l'utilisation du kit est associée à une application QIAGEN en aval, se reporter aux instructions du manuel du kit correspondant. Une étude exemplaire de vérification de la stabilité a démontré que l'ADN extrait d'échantillons de tissu de FFPE est adapté à l'utilisation avec le *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit lorsqu'il est stocké pendant une durée maximale de sept jours à 4 °C avec un stockage supplémentaire à -20 °C pendant une durée totale combinée de cinq semaines avec de multiples cycles de congélation-décongélation.

## Symboles

Les symboles suivants apparaissent dans ce document. Pour obtenir la liste complète des symboles utilisés dans le mode d'emploi ou sur l'emballage et l'étiquette, veuillez vous reporter au manuel.

| Symbole   | Définition du symbole  |
|---|--|
|  | Ce produit est conforme aux exigences de la réglementation européenne 2017/746 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. |
|  | Dispositif médical de diagnostic in vitro  |
|  | Numéro de référence  |
| <b>Rn</b>   | R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision  |
|  | Fabricant  |

## Historique des révisions

| Révision      | Description   |
|---------------|---|
| R1, juin 2022 | <p>Version 2, Révision 1</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Mise à jour vers la version 2 pour la compatibilité avec l'IDVR</li><li>• Sections concernant les substances interférentes, la contamination croisée, la stabilité des éluats et la compatibilité avec les applications en aval ajoutées</li></ul> |

Pour connaître les dernières informations sur les licences et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Marques commerciales : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, Pyrosequencing®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, theascreen® (QIAGEN Group) ; SYBR® (Life Technologies Corporation). Les noms déposés, marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

06/2022 HB-3033-D01-001 © 2022 QIAGEN, tous droits réservés.



