

# Istruzioni per l'uso (caratteristiche delle prestazioni) del QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA Blood Mini Kit

Versione 3



Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1

Le caratteristiche delle prestazioni sono disponibili in formato elettronico e nella scheda delle risorse della pagina prodotti [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Introduzione generale

Il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento e la purificazione del DNA genomico da campioni biologici.

Le procedure del QIAamp DSP DNA Blood Mini concepite per processare simultaneamente più campioni di sangue forniscono DNA purificato, pronto per l'uso. Queste procedure possono essere utilizzate con sangue intero, appena prelevato o congelato, e sangue trattato con citrato o EDTA.

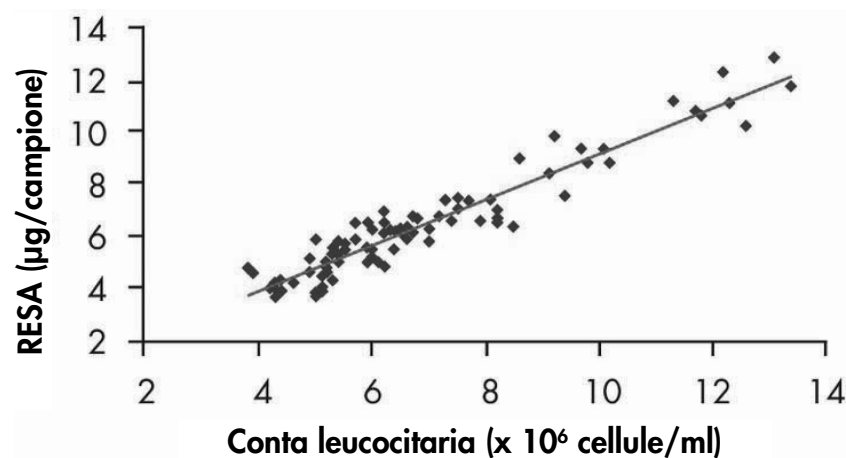
Le semplici procedure di centrifugazione e sottovuoto del QIAamp DSP sono indicate per processare simultaneamente più campioni. Alcune delle procedure di centrifugazione del QIAamp possono essere interamente automatizzate sul sistema QIAcube® Connect MDx per garantire una migliore standardizzazione e una maggiore facilità d'uso. QIAcube Connect MDx esegue l'isolamento e la purificazione automatizzati degli acidi nucleici. Può elaborare in continuo un massimo di 12 campioni a seduta.

## Caratteristiche delle prestazioni

**Nota:** Le caratteristiche delle prestazioni dipendono molto da vari fattori e sono correlate alla specifica applicazione downstream. Le caratteristiche delle prestazioni sono state definite per il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit in combinazione con applicazioni downstream ideali. Tuttavia, procedure per l'isolamento degli acidi nucleici da campione biologico sono utilizzate come front-end per diverse applicazioni downstream e per qualsiasi procedura di lavoro siffatta è necessario definire parametri di prestazione, ad esempio contaminazione crociata o precisione del processo, come parte dello sviluppo delle applicazioni downstream. Pertanto, l'utente è responsabile di convalidare l'intera procedura di lavoro per definire i parametri di prestazione appropriati.

### Prestazioni di base e compatibilità con applicazioni downstream differenti

Le prestazioni di base della procedura sottovuoto QIAamp DSP DNA Blood Mini sono state determinate con sangue fornito da donatori sani con una conta leucocitaria di  $3,8 \times 10^6$  -  $1,34 \times 10^7$  cellule/ml (vedere Figura 1).



**Figura 1. Osservazione mediante utilizzo della procedura sottovuoto del QIAamp DSP DNA Blood Mini con un volume di eluzione di 200 µl.** Sono state determinate le conte leucocitarie di donatori sani ed è stato stabilito che rientrano nel range di  $3,8 \times 10^6$  -  $1,34 \times 10^7$  cellule/ml. Il DNA è stato purificato da campioni di sangue utilizzando la procedura sottovuoto del QIAamp DSP DNA Blood Mini con un volume di eluzione di 200 µl. Sono stati processati 87 campioni in triplicato.

La quantità di DNA purificato fornita dalle procedure del QIAamp DSP DNA Blood Mini dipende dal contenuto leucocitario di ciascun campione di sangue. Utilizzando la procedura di centrifugazione o sottovuoto, il DNA genomico è purificato da 200 µl di sangue di donatori sani. È possibile utilizzare provette primarie e anticoagulanti diversi per il prelievo dei campioni di sangue per le procedure del QIAamp DSP DNA Blood Mini (Tabella 1).

Tabella 1. Rese medie relative di DNA ottenute da campioni di sangue raccolti utilizzando provette primarie e anticoagulanti diversi

Provetta primaria	Produttore	N. cat.	Volume nominale	Resa media*
BD™ Vacutainer® 9NC	BD	366007	9 ml	6,4 µg
BD Vacutainer K3E	BD	36847	10 ml	6,6 µg
BD Vacutainer K2E	BD	367864	6 ml	6,4 µg
S-Monovette® EDTA	Sarstedt®	02.1066.001	9 ml	6,5 µg
S-Monovette CPDA1	Sarstedt	01.1610.001	8,5 ml	6,3 µg
Vacurette® K3E	Greiner Bio-One®	455036	9 ml	6,5 µg
Vacurette 9NC	Greiner Bio-One	454382	2 ml	6,3 µg

Il DNA genomico è stato purificato da 200 µl di campioni di sangue di donatori sani (da 4,0 a 9,0 x 10<sup>6</sup> cellule/ml).

\* Per ciascuna provetta primaria, la resa media è determinata utilizzando 11 campioni in triplicato.

Il DNA genomico eluito può essere utilizzato in numerosi esami downstream.

## Intervallo input campione/output eluito e purezza del DNA

Per l'isolamento del DNA genomico da 200 µl di sangue intero si possono selezionare volumi di eluizione differenti. Per la procedura manuale, il range dei volumi di eluizione è compreso tra 50 e 200 µl. Per la procedura di centrifugazione completamente automatizzata, sono possibili i volumi di eluizione di 100 e 200 µl e per la procedura di centrifugazione parzialmente automatizzata (dopo lisi manuale) sono possibili volumi di eluizione di 100–200 µl (in incrementi di 10 µl). L'eluizione eseguita in volumi inferiori aumenta in modo significativo la concentrazione del DNA finale nell'eluato, ma riduce leggermente il DNA complessivo ottenuto. Si consiglia di utilizzare un volume di eluizione adeguato alla prevista applicazione a valle.

È stato valutato l'effetto di volumi di eluizione differenti sulla concentrazione totale di DNA. La Figura 2 mostra un aumento nella concentrazione di DNA negli eluiti proporzionale alla diminuzione del volume di eluizione.

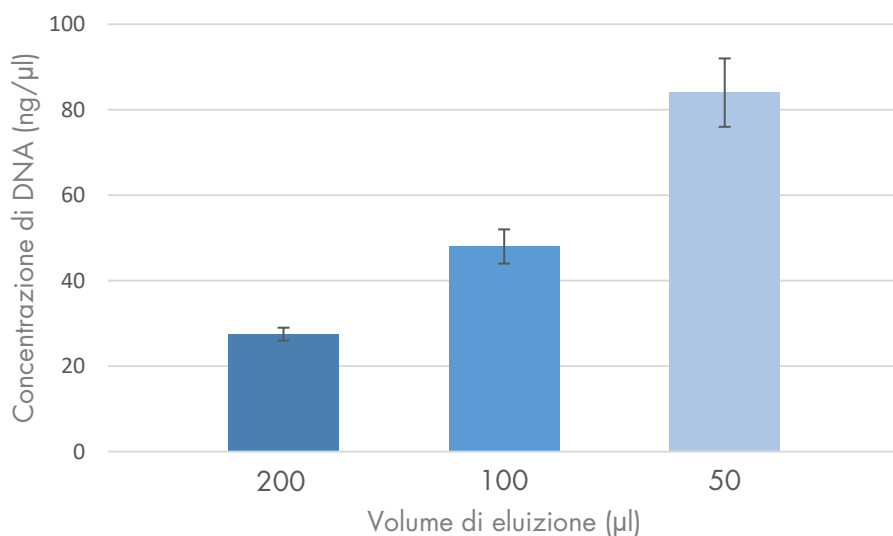


Figura 2. Concentrazione di DNA ottenuta dopo l'isolamento del DNA da sangue intero utilizzando il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit con volumi di eluizione differenti.

Ciascuna barra del grafico rappresenta i risultati ottenuti utilizzando 32 repliche (media ± deviazione standard).

Come indicatore della purezza del DNA è stato misurato il rapporto tra assorbanza a 260 e 280 nm per volumi di eluizione differenti durante il test. Non è stata osservata alcuna differenza tra volumi di eluizione differenti e soprattutto il rapporto medio ha indicato una bassa contaminazione proteica.

## Precisione

Sono stati determinati i coefficienti di variazione (CV) per l'estrazione automatizzata di DNA genomico umano da sangue intero mediante l'utilizzo del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sul QIAcube Connect MDx. La resa totale del DNA è stata determinata mediante misurazione OD.

Sono state determinate la ripetibilità (variabilità intra analisi in un'unica sessione di purificazione) e la precisione intermedia (variabilità inter analisi per sessioni di purificazione differenti con operatori differenti, su strumenti differenti e in giorni differenti). I dati di precisione sono illustrati nella Tabella 2.

Tabella 2. Analisi delle stime di precisione

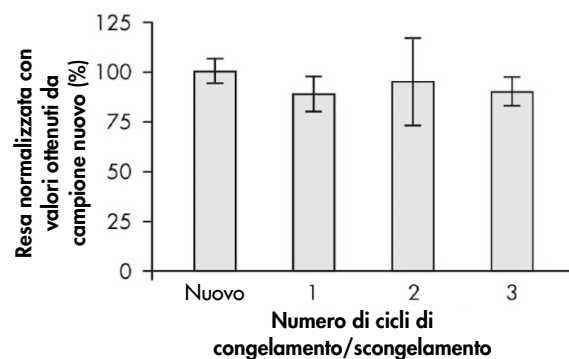
Precisione	CV (%)
Precisione intermedia	1,65
Ripetibilità	6,09
Precisione totale	6,24

Per la procedura sottovuoto manuale, le rese medie e i CV sono stati determinati e valutati al fine di valutare la precisione intermedia, la ripetibilità e la riproducibilità. Sono state inoltre analizzate l'integrità e le prestazioni del DNA in un esame real-time PCR interno.

## Stabilità del campione

Nota: La stabilità del campione dipende molto da vari fattori ed è correlata alla specifica applicazione downstream. È stata valutata con applicazioni downstream ideali. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione downstream utilizzata nel suo laboratorio e/o di convalidare l'intero flusso di lavoro per determinare le condizioni di conservazione appropriate.

Sono stati determinati gli effetti del congelamento e dello scongelamento dei campioni di sangue trattato con EDTA sulla purificazione del DNA eseguita utilizzando il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Negli esami downstream non è stata osservata una riduzione significativa della resa (vedere Figura 3) o delle prestazioni.



**Figura 3. Effetti del congelamento e dello scongelamento dei campioni di sangue.** Il sangue trattato con EDTA è stato congelato e scongelato fino a 3 volte, quindi sottoposto a purificazione del DNA mediante l'utilizzo del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Le rese del DNA calcolate sono normalizzate sulla resa del campione nuovo (100%). Ciascuna barra del grafico rappresenta i risultati ottenuti utilizzando 32 repliche (media  $\pm$  deviazione standard).

## Stabilità degli eluiti

**Nota:** La stabilità degli eluiti dipende molto da vari fattori ed è correlata all'applicazione downstream specifica. La stabilità è stata valutata per il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit in combinazione con applicazioni downstream ideali. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione downstream utilizzata nel suo laboratorio e/o di convalidare l'intero flusso di lavoro per determinare le condizioni di conservazione appropriate.

La stabilità degli eluiti per il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit è stata valutata dopo l'estrazione dell'acido nucleico da sangue umano con metodo spettrofotometrico e un esame real-time PCR interno. Il DNA eluito può essere conservato a 2–8°C per massimo 4 settimane. Sugeriamo una conservazione a –20°C per la conservazione a lungo termine.

## Sostanze interferenti

Diverse potenziali sostanze interferenti esogene ed endogene presenti nel sangue intero del paziente sono state addizionate a campioni di sangue per testare il loro impatto su esami downstream ideali dopo l'isolamento del gDNA con il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Sono state valutate le potenziali sostanze interferenti più comuni rilevanti per l'emolisi (emoglobina umana), la lipemia (trigliceridi) e l'ittero (bilirubina non coniugata). È stato inoltre valutato l'effetto interferente degli anticoagulanti K2-EDTA, K3-EDTA e Na2-EDTA a concentrazione tre volte superiore presenti nella provetta di raccolta. Non è stato osservato alcun impatto negativo significativo per questi potenziali interferenti e per circa 20 ulteriori interferenti aggiuntivi come i farmaci tipicamente assunti, ad esempio, per il trattamento del cancro, quindi molto probabilmente presenti nei campioni dei pazienti.

**Nota:** i test sono stati eseguiti utilizzando applicazioni downstream ideali per una valutazione della qualità degli acidi nucleici estratti. Tuttavia, applicazioni downstream differenti potrebbe avere requisiti differenti rispetto alla purezza (ad es. assenza o concentrazione di sostanze potenzialmente interferenti), per cui è necessario determinare anche l'identificazione e i test delle sostanze rilevanti e della rispettiva concentrazione, come parte dello sviluppo dell'applicazione downstream per qualsiasi procedura di lavoro che implica l'uso del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Qualsiasi sostanza potenzialmente interferente (ad es. farmaci) e la rispettiva concentrazione è molto specifica per l'applicazione downstream e i probabili trattamenti medici precedenti, pertanto occorre esaminarla durante la verifica dell'applicazione downstream utilizzando il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.





Nota: Secondo la ISO 20186-2:2019(E), le provette di raccolta dell'eparina dal sangue possono influire sulla purezza degli acidi nucleici isolati e il probabile carryover negli eluiti potrebbe causare inibizioni in alcune applicazioni downstream. Si raccomanda, pertanto, di utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA o citrato come anticoagulante per la preparazione del plasma.

## Contaminazione crociata

Il rischio di contaminazione crociata per la purificazione automatizzata di acido nucleico sul QIAcube Connect MDx è stato analizzato eseguendo cinque sessioni con 12 campioni con lotti alternati (alternando campioni positivi con campioni negativi), utilizzando una procedura QIAamp ideale (QIAamp DSP Virus Spin insieme a campioni di plasma e siero di 1,00E+07 replicati/ml di un virus DNA). Durante le sessioni di estrazione è stata valutata una potenziale contaminazione dei campioni negativi mediante analisi successiva degli eluiti utilizzando un esame real-time PCR interno. Per il carryover da campione a campione o da sessione a sessione non è stata rilevata contaminazione crociata.

## Simboli

Nel presente documento compaiono i simboli seguenti. Per un elenco completo dei simboli utilizzati nelle istruzioni per l'uso. O sulla confezione e sulle etichette, consultare il manuale.

Simbolo	Definizione del simbolo
	Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero di catalogo
Rn	R sta per revisione delle istruzioni per l'uso e n è il numero di revisione
	Produttore

## Cronologia delle revisioni

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	<p>Versione 3, revisione 1</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Aggiornamento alla versione 3 per conformità con IVDR</li><li>• Trasferimento e aggiornamento delle caratteristiche delle prestazioni dal manuale del kit nel presente documento:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Trasferimento della sezione Resa del DNA purificato e della sezione Prestazioni in esami downstream nella sezione Prestazioni di base e compatibilità con applicazioni downstream differenti</li><li>○ Aggiunta della sezione Intervallo input campione/output eluito e purezza del DNA</li><li>○ Aggiunta della sezione Precisione</li><li>○ Aggiornamento della sezione Stabilità degli eluiti</li><li>○ Aggiunta della sezione Stabilità del campione</li><li>○ Aggiunta della sezione Sostanze interferenti</li><li>○ Aggiunta della sezione Contaminazione crociata</li><li>○ Aggiunta della sezione Simboli</li><li>○ Aggiunta della sezione Cronologia delle revisioni</li></ul></li></ul>

Per informazioni aggiornate sulle licenze e sulle esclusioni di responsabilità specifiche del prodotto, vedere il manuale del kit QIAGEN o il manuale dell'utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH);. I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.  
HB-3030-D01-001 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.



