

DE

Gebrauchsinformation  
**Weak D-TYPE 1-2-3 Q**

Elektronische Gebrauchsinformation siehe [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)



Testkit zur Zweitbestimmung der RHD Allele RHD\*01W.1, \*01W.1.1, \*01W.2 und \*01W.3  
auf molekulargenetischer Basis  
**gebrauchsfertig**

**REF 728400**

**Inhalt**

1. Produktbeschreibung .....	2
2. Testprinzip .....	2
3. Material .....	2
3.1. Inhalt des Weak D-TYPE 1-2-3 Q Kits .....	2
3.2. Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte .....	2
3.3. Empfehlung für validierte Cycler und Reaktionsgefäße.....	3
4. Lagerung und Haltbarkeit.....	3
5. Testdurchführung.....	3
5.1. Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise .....	3
5.2. DNA Isolation .....	4
5.3. Amplifikation .....	4
5.4. Interpretation der Ergebnisse.....	5
6. Warn- und Entsorgungshinweise .....	7
7. Leistungsmerkmale.....	8
8. Grenzen der Methode .....	8
9. Interne Qualitätskontrolle .....	9
10. Problembehandlung.....	9
11. Verwendete Markennamen .....	9
12. Erklärung der Symbole auf den Etiketten.....	10
13. Literatur .....	10

**Version: 01/2019 / Stand: 2019-06**

## 1. Produktbeschreibung

Das Weak D-TYPE 1-2-3 Q Kit ist ein in vitro Diagnostikum, welches nur von qualifiziertem Personal verwendet werden sollte. Das Kit wird zur Zweitbestimmung bei serologisch diskrepanten oder zweifelhaften Rhesus D Antigenbestimmungen mit Verdacht auf Weak D eingesetzt.

Die Zusammenstellung des Oligonukleotidmixes erlaubt eine spezifische und qualitative Typisierung der Rhesus D Allele RHD\*01W.1, \*01W.1.1, \*01W.2 und \*01W.3 als Zweitbestimmung auf molekulargenetischer Basis.

## 2. Testprinzip

Der Test wird mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die DNA wird in einer PCR mit sequenz-spezifischen Primern (SSP) amplifiziert. Die Primer wurden speziell zur selektiven Amplifikation der Exons 1, 6 und 9 des RHD Gens, die nur die RHD\*01W.1, \*01W.1.1, \*01W.2 und \*01W.3 Typen erfassen, entwickelt. Die Amplifikate werden mit ebenfalls genortspezifischen Hydrolyse-Sonden (TaqMan®-Sonden) mittels Real-Time PCR (RT-PCR) nachgewiesen, wodurch die diagnostische Sensitivität und Spezifität des Test im Vergleich zur klassischen SSP-Technik erhöht wird.

Wenn Amplifikate vorhanden sind, werden die Sonden durch die Taq Polymerase hydrolisiert und es entsteht ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur Menge des PCR-Produkts ansteigt. Die Fluoreszenzsignale werden von der optischen Detektionseinheit des RT-PCR Cyclers gemessen. Der Test wird in einer einzigen PCR-Reaktion durchgeführt, in der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen die interne Kontrolle (humanes HBB Gen) und die assoziierten Typen nachgewiesen werden.

## 3. Material

### 3.1. Inhalt des Weak D-TYPE 1-2-3 Q Kits

- **230 µl Q Primermix WD123**, gebrauchsfertig, enthält Primer und Sonden
- **230 µl Q Mastermix**, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer
- **Gebrauchsinformation**

### 3.2. Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- Reagenzien zur DNA Isolation (validierte Extraktionskits siehe 5.2)
- Real-Time PCR Cycler (validierte Cycler s. 3.3)
- RT-PCR Reaktionsgefäße mit Deckeln oder Abdeckfolien (validierte Produkte s. 3.3)
- Aqua dest.
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen

### 3.3. Empfehlung für validierte Cycler und Reaktionsgefäße

Cycler	RT PCR Reaktionsgefäße	RT PCR Verschlusssystem
CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Fa. Bio-Rad	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate, 96 white wells, black frame, Product No. 4ti-1201 Fa. 4titude/Brooks Life Sciences	4titude Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Optically clear adhesive film, Product No. 4ti-0560 Fa. 4titude//Brooks Life Sciences
MIC (Magnetic Induction Cycler), Fa. Bio Molecular Systems	Tubes and caps: MIC-TUBES No. 68MIC-60653 Exklusiver Vertrieb (D/A): Fa. Biozyme	
Rotor-Gene Q, Fa. Qiagen	Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, Cat No./ID 981103 oder 981106, Fa. Qiagen	

**Hinweis:** Bei Verwendung von anderen Real-Time-Thermocyclern, Reaktionsgefäßen und Verschlusssystemen müssen diese vom Anwender validiert werden.

## 4. Lagerung und Haltbarkeit

Die Kits werden ungekühlt versandt. Nach Erhalt müssen alle Reagenzien bei  $\leq -20$  °C in temperaturüberwachten Geräten gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett der jeweiligen Reagenzien angegeben. Das auf dem Außenetikett angegebene Verfallsdatum bezieht sich auf den Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit. Die Testung der Auftau-Gefrierzyklen hat ergeben, dass bis zu 15 Zyklen keinen nachteiligen Effekt auf die Qualität des Kits haben. Die Fluorophor gelabelten Sonden sind sehr lichtempfindlich. Die Reagenzien im Dunkeln aufbewahren.

## 5. Testdurchführung

### 5.1. Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Molekulargenetische Techniken sind besonders sensitive Methoden und sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal mit Erfahrung in molekulargenetischen Techniken durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Tests dürfen nicht als alleinige Grundlage für klinische Entscheidungen verwendet werden.

Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- prinzipiell mit Handschuhen (möglichst puderfrei) arbeiten
- bei jedem Pipettierschritt neue Spitzen (mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel) verwenden
- wenn möglich zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Detektion) einrichten
- Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen.

## 5.2. DNA Isolation

Das Probenmaterial für die Isolation der genomischen DNA muss in geeigneten Abnahmesystemen verschickt werden. Für den Test ist EDTA- oder Citrat-Blut erforderlich. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen (3), derartige Abnahmesysteme sind daher nicht geeignet und dürfen nicht verwendet werden.

Es wird empfohlen, für die DNA-Isolation CE IvD zugelassene Extraktionskits zu verwenden.

### Validiertes DNA Extraktionskit:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (Säulen)

Wenn die im Labor etablierte Standardmethode zur Isolation von gDNA verwendet werden soll, und dafür das genannte Testkit nicht verwendet wird, muss diese vom Anwender validiert werden.

Für den Weak D-TYPE 1-2-3 QTest ist eine DNA-Konzentration von 10-150 ng/µl erforderlich.

Die Reinheitsindices müssen sich im folgenden Bereich befinden:

- $OD_{260}/OD_{280} = > 1,5$  und  $< 2,0$   
Höhere Werte deuten auf das Vorhandensein von RNA hin, niedrigere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen.
- $OD_{260} / OD_{230} = > 1,8$   
Niedrigere Werte deuten auf eine Kontamination mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln hin.

## 5.3. Amplifikation

Es sollten die vom Hersteller des Real-Time PCR-Geräts empfohlenen Reaktionsgefäße verwendet werden bzw. die empfohlenen Materialien (siehe Punkt 3.3).

Für jede Probe die folgenden Reagenzien in ein Reaktionsgefäß pipettieren:

- 2 µl Q Primermix
- 2 µl Q Mastermix
- 1 µl Proben DNA (10-150 ng/µl)
- 5 µl Aqua dest.

Das Reaktionsvolumen für jeden RT PCR-Ansatz beträgt 10 µl.

**Ausnahme: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q Cyclers beträgt das Reaktionsvolumen für jeden RT-PCR-Ansatz 20 µl. Dementsprechend müssen die angegebenen Volumen für den Reaktionsansatz verdoppelt werden.**

Wenn ein Prä-Mix aus Q Primermix, Q Mastermix und Aqua dest. für mehr als eine Probe hergestellt wird, bitte ein angemessenes Zusatzvolumen für Pipettierverluste einrechnen.

Wenn eine **Negativkontrolle (NTC)** mitgeführt werden soll, eine PCR Reaktion mit Aqua dest. anstatt der Proben-DNA ansetzen.

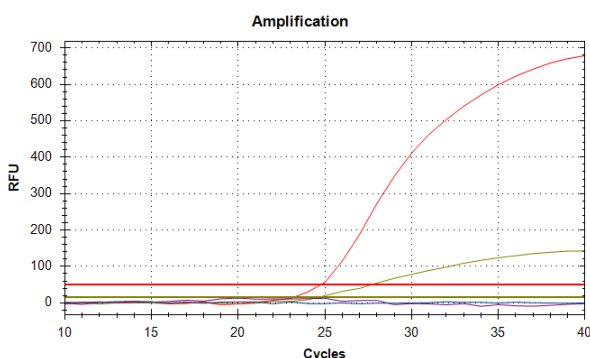
Die Reaktionsgefäße verschließen und die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugieren. Sicherstellen, dass sich keine Blasen in den Reaktionsgefäßen befinden. Wenn Blasen auftreten, die Gefäße vorsichtig auf den Labortisch klopfen, um diese zu entfernen. Dann die PCR-Reaktion mit den folgenden Parametern durchführen.

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl Zyklen
Initiale Aktivierung	10 Min	96°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 Sek	96°C	40 Zyklen
Annealing + Extension	40 Sek + Messung	64°C	

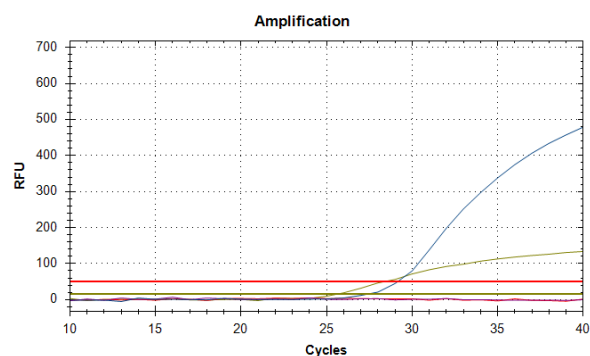
- Bei der Benutzung des Magnetic Induction Cyclers (MIC) oder des CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems, ist die Grundeinstellung des Geräts zu verwenden.
- Bei Verwendung des Rotor-Gene Q Cyclers beträgt das Reaktionsvolumen für jeden RT-PCR Ansatz 20 µl. Bei der Analyse der Daten kann die Funktion „Use noise slop correction“ verwendet werden.

#### 5.4. Interpretation der Ergebnisse

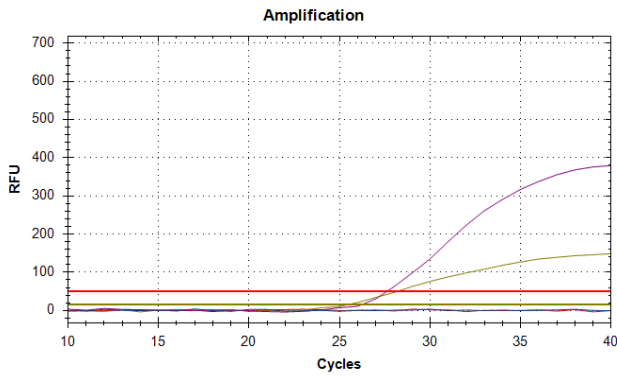
Alle Testansätze mit humaner gDNA müssen Fluoreszenzsignale im Kanal 2 (gelber- VIC Kanal) der internen Amplifikationskontrolle (IAC) aufweisen. Eine RHD\*01W.1 positive Probe zeigt ein positives Signal im Kanal 3. Eine RHD\*01W.2 positive Probe zeigt ein positives Signal im Kanal 1. Eine RHD\*01W.3 positive Probe zeigt ein positives Signal im Kanal 4. Eine RHD\*01W.1.1 positive Probe zeigt positive Signale im Kanal 3 und 4, wie in den Abbildungen 1 - 4 dargestellt.



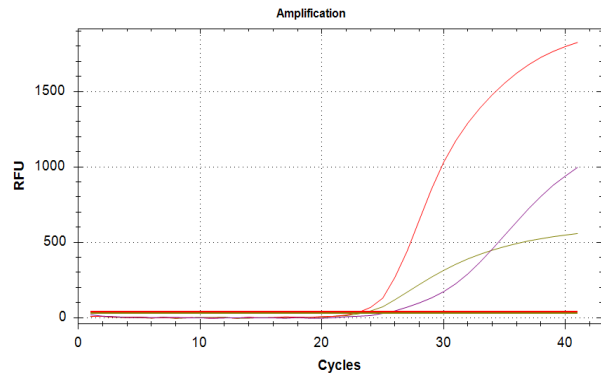
**Abbildung 1:** Weak D Typ 1 Probe (RHD\*01W.1) **rot-** Texas Red Kanal



**Abbildung 2:** Weak D Typ 2 Probe (RHD\*01W.2) **blau-** FAM Kanal



**Abbildung 3:** Weak D Typ 3 Probe (RHD\*01W.3) lila- CY5 Kanal



**Abbildung 4:** Weak D Typ 1.1\* Probe (RHD\*01W.1.1) roter und lila Kanal

\*RHD\*01W.1 in Kombination mit RHD\*01W.3 kann nicht ausgeschlossen werden

Farbkanal	Spezifität#
Kanal 3/Texas Red (Weak D Typ 1 positiv)	RHD*01W.1 RHD*weak D type 1
Kanal 1/FAM (Weak D Typ 2 positiv)	RHD*01W.2 RHD*weak D type 2
Kanal 4/Cy.5 (Weak D Typ 3 positiv)	RHD*01W.3 RHD*weak D type 3
Kanal 3+4/ Texas Red+Cy.5 (Weak D Typ 1.1 positiv)	RHD*01W.1.1 RHD*weak D type 1.1

# Folgende Allele können nicht ausgeschlossen werden: RHD\*01W.1.2; RHD\*01W.2.1, 2.2; RHD\*01W.3.1, 3.2.

Amplifikationssignale von Proben, welche nicht die Weak D Typen 1, 1.1, 2, oder 3 aufweisen, sollten sich außerhalb der definierten Cq Werte der Farbkanäle 1, 3 und 4 befinden. Eine Negativkontrolle mit Aqua dest. (NTC) darf über den gesamten RT-PCR-Lauf keine Fluoreszenzsignale entwickeln und dient als Kontaminationskontrolle. Wenn bei der Negativkontrolle mit Aqua dest. Fluoreszenzsignale innerhalb der definierten Cq-Werte auftreten, weist dies auf eine Kontamination hin. Fluoreszenzsignale außerhalb der definierten Cq-Werte können aufgrund der sehr sensitiven Testmethode bei ungenauem Pipettieren auftreten. Tritt dieser Fall auf, sollte die Testung wiederholt werden.

Es gelten die folgenden Werte für positive Signale:

	Farbkanal	Vordefinierter Threshold	Cq-Level	LOD-Cq	Wellenlänge in nm
RHD*01W.1, positiv	Kanal 3/ Texas Red	100	21	29	Excitation: 597 Emission: 616
RHD*01W.1.1, positiv	Kanal 4/ Cy. 5	100	25	34	Excitation: 651 Emission: 674
	Kanal 3/ Texas Red	100	21	29	Excitation: 597 Emission: 616
RHD*01W.2, positiv	Kanal 1/ FAM	100	25	31	Excitation: 495 Emission: 520
RHD*01W.3, positiv	Kanal 4/ Cy. 5	100	25	34	Excitation: 651 Emission: 674
Interne Positivkontrolle	Kanal 2/ VIC	50	19	29	Excitation: 538 Emission: 554

**Hinweise:** Der vordefinierte Threshold ist nur bei der Kombination von CFX96 Cycler mit weißen PCR Reaktionsgefäßen zu wählen. Die Kanalbezeichnung 1 - 4 bezieht sich auf den CFX96 real time Cycler und kann bei anderen Real time Cycler Systemen abweichen. Wird der Magnetic Induction Cycler verwendet, sollte "auto set threshold" ausgewählt werden.

Cq-Level ist der PCR-Zyklus bei dem ein positiver Nachweis des Farbkanals vom Hintergrund erfolgt.

LOD-Cq ist der maximale PCR-Zyklus bei dem ein positiver Nachweis des Farbkanals vom Hintergrund korrekt gewertet werden kann.

## 6. Warn- und Entsorgungshinweise

Weak D-TYPE 1-2-3 Q ist für den Gebrauch als In vitro Diagnostikum konzipiert und sollte nur von speziell ausgebildetem, qualifiziertem Personal verwendet werden. Alle Arbeiten sollten unter Berücksichtigung der guten Laborpraxis durchgeführt werden.

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen.

Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien bei der Entnahme von Aliquots sollte vermieden werden. Der Gebrauch von sterilen Einmalpipetten und Pipettenspitzen wird empfohlen. Keine Reagenzien mit Trübung oder Anzeichen für mikrobielle Kontamination verwenden.

Ein Sicherheitsdatenblatt bzw. eine Erklärung zu Sicherheitsdatenblättern (SDB) kann unter [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com) heruntergeladen werden.

## 7. Leistungsmerkmale

Die Kombination der Primer und Sonden gewährleistet eine eindeutige Bestimmung der in Kapitel 5.4 spezifizierten Rhesus D Allele. Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität des Testkits wird für jede Lot anhand von vortypisierten Referenzproben überprüft.

Für den Weak D-TYPE 1-2-3 Q Kit wurden Leistungsstudien mit insgesamt 526 vortypisierten DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen anderer CE-zertifizierter Typisierungsreagenzien (u.a. Serologie, SSO, SSP) und/oder Sequenzierung verglichen. Es wurde eine Übereinstimmung von 99,8 % erreicht.

	Gesamtzahl ohne NTC	WD1	WD1.1	WD2	WD3	IAC	Übereinstimmung in Prozent [%]
<i>Interne Studie</i>	335	18	2	6	5	335	100
<i>Externe Studie</i>	191	60	11	39	14	190	99,5
<b>Gesamt</b>	<b>526</b>	<b>78</b>	<b>13</b>	<b>45</b>	<b>19</b>	<b>525</b>	<b>99,8</b>

Tabelle: Zusammenfassung der Probenanzahl für die internen und externen Leistungsstudien, der Ergebnisse mit Angabe der Übereinstimmung in Prozent zur Referenztypisierung und Nachweis von Weak D Typ 1, 1.1, 2 and 3.

## 8. Grenzen der Methode

Da das RT-PCR Verfahren sehr empfindlich auf Kreuz-Kontaminationen von DNA reagiert, ist bei der Isolation hierauf zu achten. Validierungstests innerhalb der Leistungsbewertungsstudie des Weak D-TYPE 1-2-3 Q Kits haben gezeigt, dass DNA Mengen von 10 ng bis 150 ng pro Reaktion keinen signifikanten Einfluss auf den spezifischen Nachweis der Weak D Typ 1, 1.1, 2, oder 3 Allele haben.

Es sollte besonders darauf geachtet werden, Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplikons oder DNA zu vermeiden. Die regelmäßige Durchführung von Wischtests (z.B. BAG Wischtest, REF 7091) und die Mitführung einer Negativkontrolle mit Aqua dest. bei jedem Testlauf werden empfohlen.

In der Negativkontrolle mit Aqua dest. darf kein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Cq > N.A.).

Im Fall einer Signalentwicklung in der Negativkontrolle (Kanal 2) ist der PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und gegebenenfalls die Reagenzien auszutauschen.

Alle Geräte (z.B. Pipetten, Realtime-Geräte) müssen entsprechend der Herstellervorgaben kalibriert werden.



## 9. Interne Qualitätskontrolle

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots des Weak D-TYPE 1-2-3 Q Kits können mit einer Kombination von DNA Proben mit bekannten RH Weak D Typen durchgeführt werden. Eine interne Kontrolle zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation ist im Q Primermix enthalten.

Die Mitführung von Negativkontrollen zum Nachweis möglicher Kontaminationen wird empfohlen. Zu diesem Zweck wird eine PCR Reaktion ohne DNA angesetzt.






## 10. Problembehandlung

Fehler	mögliche Ursache	mögliche Lösung
<b>Schlechtes bzw. kein Signal</b>	Vorhandensein eines Inhibitors.	Frische Reagenzien verwenden.
	Keine gDNA im Reaktionsansatz.	Test wiederholen. Auf richtiges Pipettieren achten.
	Falsche Amplifikationsparameter.	PCR-Programm sowie Ramp Rate (Heizrate) überprüfen.
	Verunreinigte oder degradierte DNA.	DNA-Konzentration/Qualität überprüfen. DNA auf einem Gel überprüfen. DNA-Isolierung wiederholen.
	Fluoreszenzsonden bzw. Primer degradiert.	Neuen Primer Mix verwenden. Lichtexposition sowie häufiges Einfrieren/ Auftauen vermeiden. Lagerungsbedingungen beachten!
	Bläschen im Reaktionsansatz / Restflüssigkeit an der Innenwand.	Vorsichtiges Pipettieren. Abzentrifugieren der PCR Platte.
	Nicht kompatible bzw. qualitativ minderwertige RT-PCR Plastikware.	Verwendung von kompatibler und hochwertiger Plastikware. Siehe Punkt 3.3.
	Falsche Signalverrechnung durch abnormale Amplifikationssignale in den initialen Zyklen eines Laufes.	Anwendung von Korrekturmaßnahmen durch Software (z.B. "apply fluorescence drift correction"-Funktion von Bio-Rad oder Ausschluss der ersten fünf Cyclen aus der Analyse).
	Verdunstung der Reagenzien durch unsachgemäßes Verschließen der PCR Gefäße	Prüfung auf korrektes Verschließen. Vorsicht bei Klebefolien im Randbereich.
<b>Signal in Negativkontrolle</b>	Kontamination der Negativkontrolle mit DNA	Wiederholung der Negativkontrolle. Dekontamination des Arbeitsplatzes.

## 11. Verwendete Markennamen

TaqMan® ist ein Markenname der Firma Roche Molecular Systems Inc.

## 12. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Ausreichend für n Tests
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller
<b>BLOOD TYPING</b>	Zweckbestimmung: Blutgruppenbestimmung
<b>IFU</b>	Gebrauchsinformation
<b>IVD</b>	In-vitro-Diagnostikum
<b>LOT</b>	Lot-Nr.
<b>Q Primermix   WD123</b>	Oligonukleotidmix zur Bestimmung von Weak D 1, 1.1, 2 and 3
<b>Q Mastermix</b>	Mastermix für den Weak D-TYPE 1-2-3 Q Kit
<b>REF</b>	Bestell-Nr.

## 13. Literatur

1. Wagner FF et. al. Blood. 1999 Jan 1; 93(1):385-93.
2. Geoff Daniels, Human Blood Groups, 3rd edition.
3. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com) oder kontaktieren Sie uns direkt über [info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com).