

CZ

Návod k použití

ERY Q Kits

CE IVD

Testovací soupravy pro stanovení krevních skupin, specifit HNA a HPA pomocí molekulárně biologických metod

REF katalogové číslo 728401	ERY Q Weak D
REF katalogové číslo 728402	ERY Q HPA
REF katalogové číslo 728403	ERY Q Partial D
REF katalogové číslo 728404	ERY Q HNA
REF katalogové číslo 728405	ERY Q RH

Obsah

1. Zamýšlené použití	2
2. Popis výrobku	2
3. Princip testu	2
4. Materiál	2
4.1 Obsah souprav	2
4.2 Další potřebné reagentie a vybavení	3
4.3 Validované RT PCR cykléry	3
5. Skladování a stabilita	3
6. Průběh testu	3
6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky	3
6.2 Izolace DNA	4
6.3 Amplifikace	4
6.4 Evaluace a interpretace výsledků	5
7. Varování a preventivní opatření	6
8. Specifická souprav	7
9. Výkonost testů	8
10. Omezení metody	9
11. Interní kontrola kvality	9
12. Řešení problémů	10
13. Ochranné známky použité v tomto dokumentu a na výrobku:	10
14. Vysvětlení symbolů na etiketách	11
15. Literatura	11

Verze: 01/2020 / Publikováno: 2020-07

1. Zamýšlené použití

Soupravy ERY Q byly vytvořeny pro typizaci krevních skupin a pro stanovení charakteristik krevních destiček a granulocytů pomocí vzorků DNA od dárců, příjemců a těhotných žen. Jsou určeny pro používání trénovanými kvalifikovanými pracovníky ve specializovaných laboratořích. Molekulárně genetická typizace využívá techniky SSP PCR a real-time detekce (Realtime PCR) amplikonů.

Soupravy ERY Q RH, -Partial D a Weak D jsou zamýšleny výhradně jako druhá metoda pro určení charakteristik RH, částečného D a slabého D. Jejich smyslem je doplnit a zpřesnit předběžné sérologické nálezy v případech nejasných nebo sporných výsledků.

Pro určení charakteristik HPA a HNA soupravami ERY Q HPA a ERY Q HNA není prvotní sérologická typizace nutná.

2. Popis výrobku

Soupravy ERY Q se používají pro molekulárně genetické stanovení krevních skupin, HNA a HPA alel. Soupravy pokrývají veškeré klinicky relevantní alely, viz kapitola 8 – Specificita souprav. Soupravy ERY Q obsahují veškeré reagenty potřebné k provedení PCR reakce. Vyhodnocení testů se provádí pomocí softwaru PlexTyper.

3. Princip testu

Výchozím materiálem pro test je genomická DNA. DNA je amplifikována v PCR reakci pomocí sekvenčně-specifických primerů (SSP). Primery byly speciálně navrženy tak, aby selektivně amplifikovaly segmenty genů specifických pro jednotlivé alely nebo alelické skupiny. Amplikony jsou detekovány hydrolizačními próbami (TaqMan® próby) specifickými k příslušnému genovému lokusu za použití metody real-time PCR (RT PCR), která oproti klasické SSP technice zvyšuje diagnostickou specificitu i senzitivitu testu. Pokud jsou amplikony přítomny, próby jsou hydrolyzovány Taq polymerázou a je generován fluorescenční signál úměrný množství PCR produktu. Fluorescenční signál je měřen optickou jednotkou real-time PCR cykléru. V každé multiplexové PCR reakci je zahrnuta také interní amplifikační kontrola (lidský HGH gen), která je detekována na jiném barevném kanálu než specifické reakce.

4. Materiál

4.1 Obsah souprav

- **260 µl Plex Mix**, připraven k použití, obsahuje dNTPs, Taq polymerázu a reakční pufr
- **12 x ERY Q 8 jamkové PCR stripy** pro molekulárně genetické určení krevních skupin, HNA a HPA specificit. Předkapané a vysušené reakční mixy obsahují specifické primery a próby a také HGH kontrolní primery a próby (oligomixy).
- **12 x PCR víčka (á 8)**

4.2 Další potřebné reagentie a vybavení

- Reagentie pro izolaci DNA (validované DNA izolační soupravy viz kapitola 6.2)
- Real-Time PCR cyklér (validované cykléry viz kapitola 4.3)
- Destilovaná voda
- Pístové pipety (0,5 – 1000 µl) a špičky

4.3 Validované RT PCR cykléry

Bio-Rad: CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System

Ve výrobcích řady ERY Q jsou využívány následující fluorofory:

Fluorofor	Vlnová délka v nm
FAM	Excitace: 495 Emise: 520
CAL Fluor® Orange 560	Excitace: 538 Emise: 559
CAL Fluor® Red 610	Excitace: 590 Emise: 610
Quasar® 670	Excitace: 647 Emise: 670

5. Skladování a stabilita

Skladovat veškeré reagentie je nutno při ≤ -20 °C v mrazácích s kontrolovanou teplotou. Soupravy jsou dodávány chlazené s chladicí vložkou. Datum expirace je uvedeno na etiketě každé reagentie. Datum expirace uvedené na obalu soupravy odpovídá reagentii s nejkratší stabilitou obsaženou v soupravě. Opakované cykly rozmrazování a zamrazování pro Plex Mix neprokázaly pro šest opakování žádný vliv na výkonnost testu. Pokud je to nutné, doporučuje se připravit si aliquoty Plex Mixu.

6. Průběh testu

6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky

Molekulárně genetické metody jsou velmi citlivé a musí být prováděny pouze dobře zaškolenými osobami, zkušenými v technikách molekulární genetiky.

Je nutné dodržovat zvláštní bezpečnostní opatření, aby se předešlo kontaminacím, a tím i falešným výsledkům:

- ◆ Pracujte v rukavicích (pokud je to možné, tak bez obsahu pudru).
- ◆ Používejte novou špičku (s integrovaným filtrem) na každý pipetovací krok.
- ◆ Používejte oddělená pracovní místa pro jednotlivé kroky: pre-amplifikační fáze (DNA izolace a příprava reakce) a post-amplifikační fáze (detekce).

- ◆ Používejte nástroje, reagentie a přístroje samostatně pro každé pracovní místo zvlášť a nepřenášejte je.

6.2 Izolace DNA

Materiál pro izolaci genomické DNA musí být dodán ve vhodném sběrném systému. Pro test je vhodná EDTA nebo citrátová krev. Přítomnost heparinu může inhibovat PCR, a tudíž nejsou sběrné systémy s heparinem vhodné (1) a nelze je použít.

Doporučené soupravy pro izolaci DNA:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (kolonky)

Jsou vhodné pro manuální nebo automatickou izolaci DNA (QIAcube).

Pokud používáte jinou než doporučenou metodu extrakce gDNA, je nutné, aby ji uživatel validoval.

DNA musí mít tyto indexy čistoty:

- $OD_{260}/OD_{280} = > 1,5$ and $< 2,0$
Vyšší hodnoty znamenají přítomnost RNA, nižší kontaminaci proteiny.
- $OD_{260}/OD_{230} = > 1,8$
Nižší hodnota indikuje možné znečištění uhlovodíky, solemi nebo organickými rozpouštědly.

6.3 Amplifikace

Poznámka:

- Reakční objem každé RT-PCR reakce je 10 μ l (každá mikrozkušavka / jamka).
- Pro test je nutná koncentrace DNA 10 – 30 ng/ μ l.

Pipetování:

Pro každou mikrozkušavku / jamku testu je třeba napipetovat 2 μ l Plex Mixu, 1 μ l DNA vzorku a 7 μ l destilované vody.

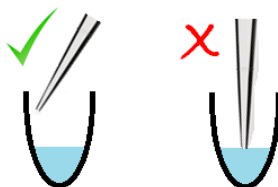
Pro každý vzorek (8 jamkový strip) si připravte premix (doporučujeme 9 násobek hodnot pro jednu mikrozkušavku).

18 μ l Plex Mix
9 μ l DNA vzorku
63 μ l destilovaná voda.

Následně z tohoto premixu napipetujte 10 μ l do každé z 8 mikrozkušavek.

Pokud chcete provést **negativní kontrolu (NTC)** připravte test s destilovanou vodou místo DNA vzorku.

Poznámka: Při pipetování do PCR mikrozkuvek je důležité zabránit kontaktu špičky s usušeným mixem na dně jamky (obarven na modro). Doporučujeme pipetovat proti stěně mikrozkuvky (viz obr. 1).



Obrázek 1: Schématické znázornění pipetování

Uzavřete reakční zkuševky a krátce stočte obsah. Ujistěte se, že víčka jsou **dokonale uzavřena**. Ujistěte se, že ve zkuševkách **nejsou žádné bublinky**. Pokud jsou bublinky přítomny, odstraňte je lehkým poklepáním o desku stolu.

Spusťte PCR program s následujícími parametry:

Tabula: PCR program

Krok programu	Čas [s]	Teplota [°C]	Ramp rate [°C/s]	Plate read	Počet cyklů
Počáteční aktivace	120	96	2,5	-	1
Denaturace	5	98	2,5	-	13
Annealing + Extenze	25	68	2,2	-	
Denaturace	5	98	2,5	-	37
Annealing + Extenze	25	68	-	ano	

Poznámka: Na cykléru CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System je nutné použít modifikovanou rychlost zahřívání (ramp rate). Hodnoty jsou popsány v tabulce PCR program výše (sloupec “Ramp rate”)

Jiné cykly nejsou validovány a může být nutné použít jiné parametry PCR. Pro interpretaci výsledků je nezbytný software PlexTyper software a ten importuje data pouze z validovaných cyklérů.

6.4 Vyhodnocení a interpretace výsledků

Pro vyhodnocení a interpretaci dat je nutné využít software PlexTyper (zdarma od BAG Diagnostics pro naše zákazníky) spolu se šaržovými soubory pro jednotlivé soupravy. Tyto soubory jsou nezbytné pro interpretaci výsledků a jsou ke stažení na webových stránkách BAG Diagnostics GmbH (www.bag-diagnostics.com) v části pro stahování souborů (download area).

Ujistěte se, že používáte správný soubor pro odpovídající výrobek a jeho šarži (lot). Použití nesprávného souboru vede nesprávné genotypizaci.

Pro interpretaci výsledků je nutno přenést data z cykléru do počítače s nainstalovaným softwarem PlexTyper od BAG Diagnostics (pomocí vhodné USB flash paměti). Pro interpretaci prosím prostudujte Návod k použití softwaru PlexTyper.

Je možné, ale nikoliv nezbytné, provést hrubou kontrolu dat v softwaru cykléru. Například validní amplifikace musí vykazovat použitelný amplifikační signál pro vnitřní amplifikační kontrolu ve FAM kanálu. Pozitivní reakce pak ukazují pozitivní barevný signál v odpovídacích kanálech.

Negativní kontrola (NTC) se používá jako kontaminační kontrola. Pokud jsou vlivem kontaminace přítomny amplikony nebo DNA v NTC reakci, objeví se pozitivní signál. Pokud je Cq menší než 36, pak je to softwarem PlexTyper interpretováno jako možná kontaminace. Amplifikační signál vyšší než Cq 36 v NTC reakci je považován za amplifikační artefakt a není brán v potaz. Pokud předpokládáme kontaminaci PCR, je žádoucí postupovat podle místních dekontaminačních předpisů a vyměnit reagenty.

Hrubá data získaná softwarem cykléru se importují do softwaru PlexTyper. V závislosti na hodnotách Cq, RFU (Relative Fluorescence Units) a tvaru amplifikační křivky určí software PlexTyper pozitivní a negativní reakce, z nichž je pak vypočítána molekulárně genetická typizace krevních skupin nebo HNA / HPA specifit daného vzorku.

7. Varování a preventivní opatření

Soupravy smí používat pouze speciálně trénované a kvalifikované osoby. Veškerá práce musí být ve shodě se Standardy správné laboratorní práce.

S biologickým materiálem použitým k extrakci DNA (např. krví) je nutné zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Při manipulaci s biologickým materiálem doporučujeme dodržovat odpovídající opatření (nepipetujte ústy, noste jednorázové rukavice při manipulaci se vzorkem i při provádění testu, dezinfikujte si ruce po provedení testu).

Biologický materiál je nutné před likvidací inaktivovat (např. v autoklávu). Stejně tak by měly být po použití inaktivovány nebo spáleny jednorázové pomůcky.

Vylitý potenciálně infekční materiál by měl být ihned odstraněn savým papírovým ubrouskem a kontaminovaná oblast očištěna standardním desinfekčním prostředkem nebo 70% alkoholem. Materiál použitý na úklid včetně rukavic je nutné před likvidací inaktivovat (např. v autoklávu).

Likvidace všech vzorků, nepoužitých činidel a odpadu by měla být v souladu s místní legislativou a nařízeními.

Je třeba zabránit mikrobiální kontaminaci reagentů při tvorbě aliquotů. Doporučujeme používat sterilní jednosměrné pipety a špičky. Zakalené reagenty a/nebo reagenty vykazující jakékoli znaky mikrobiální kontaminace nesmí být použity.

Bezpečnostní listy (MSDS), respektive prohlášení k Bezpečnostním listům jsou k dispozici ke stažení na www.bag-diagnostics.com.

8. Specificita souprav

Kombinace primerů a prób umožňuje detekci lidských krevních skupin a specifit HNA a HPA v souladu s hodnotami uvedenými v datových souborech jednotlivých šarží. Přesnost a reprodukovatelnost výsledků testů souprav je testována pro každou novou šarží pomocí kontrolních vzorků o známém genotypu.

Souprava	Průkaz následujících krevních skupin, HNA a HPA charakteristik	
ERY Q HPA REF kat.č. 728402	HPA 1a / 1 b HPA 2a / 2 b HPA 3a / 3b HPA 4a / 4b HPA 5a / 5b HPA 6a / 6b HPA 9a / 9b HPA 15a / 15b	
ERY Q HNA REF kat.č. 728404	HNA 1a / 1b / 1c HNA 2 (*787A) / 2null (*787T) HNA 3a / 3a var./b HNA 4a / 4b HNA 5a / 5b	
ERY Q RH REF kat.č. 728405	RHD*01 (DD) RHD*01N.01 (dd) RHD*DEL1 (K409K) RHD*11 (M295I) RHD* DEL8 (IVS3+1G>A) RHD*08N.01 (Psi/Ψ) RHD-CE (8-9)-D RHD*01N.08 (W16X)	RHCE*C RHCE*C ^W RHCE*E RHCE*e RHCE*c
ERY Q Weak D REF kat.č. 728401	RHD*01W.1.1 RHD*01W.1 RHD*01W.2 RHD*01W.3 RHD*01W.38 RHD*01W.5 RHD*01W.17 RHD*15 RHD*01W.20	RHD*01W.31 RHD*09.01.00 RHD*01EL.01 RHD*01EL.08 RHD*09.05 RHD*08N.01 RHD*01W.14 RHD*11 RHD*09.03.01,09.04

Souprava	Průkaz následujících krevních skupin, HNA a HPA charakteristik	
ERY Q Partial D REF kat.č. 728403	RHD*01	RHD*10.04, *10.05., *10.05.01
	RHD*01N.01	RHD*14.01
	RHD*02	RHD*14.02
	RHD*03.01,03.03	RHD*17.01 - *17.03
	RHD*03.02	RHD*17.05
	RHD*04.01	RHD*08N.01
	RHD*04.06, *04.05	RHD*19
	RHD*04.03	RHD*25
	RHD*04.04	RHCE*01.22
	RHD*05.01-*05.10 RHD*13.01,*13.02	RHD*01N.02
	RHD*06.01	RHD*01N.03
	RHD*06.02	RHD*01N.04
	RHD*06.03	RHD*01N.05
	RHD*06.04	RHD*01N.07
	RHD*07.01, 07.02	RHD*D-CE(8-9)-D
	RHD*09.01.00	RHD(delEx9)
	RHD*09.02.00, *09.02.01	RHD*D-CE(10)
RHD*10.00-*10.03, *10.06 - *10.15	RHD*01N.09	

9. Výkonost testů

Pro soupravy ERY Q HPA, HNA, RH, Weak D a Partial D byly provedeny studie výkonosti pomocí předem otypovaných vzorků DNA. Výsledky typizace pomocí souprav ERY Q byly porovnány s jinými CE-certifikovanými typizačními soupravami (t.j. SSP, sérologickými) a také s sekvenačními daty.

Pokud nebyly dostupné vzorky pro vzácné alely DNA, byly tyto nahrazeny vzorky se syntetickou DNA a následně byla testována reaktivita těchto vzorků.

Externí a interní studie výkonosti souprav ERY Q byly provedeny kvalifikovanými pracovníky v různých centrech dárců krve, laboratořích i v laboratoři BAG Diagnostics. Typizace se soupravami ERY Q kits prokázala následující shody s referenčními typizacemi:

Souprava	Množství testovaných vzorků	Shoda s referenční typizací
ERY Q HPA	116	100%
ERY Q HNA	80	100%
ERY Q RH	200	100%
ERY Q Weak D	200	100%
ERY Q Partial D	200	100%

10. Omezení metody

Pokud nejsou pomocí soupravy ERY Q získány jasné výsledky (např. protože je přítomna neznámá alela, která není detekována současnými primery a próbami), je nutno následovat národní transfuzní směrnice a postupovat podle sérologické typizace. Doporučujeme také sekvenování nejasných výsledků pro získání jasného genotypu. Výsledky testů by měly být hodnoceny s přihlédnutím ke genetické skladbě dané etnické skupiny. V případě rozporu je platný fenotyp.

Jelikož je metoda RT-PCR velice citlivá, je nutné provádět extrakci DNA velmi opatrně, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci. Zvláštní opatrnost je třeba věnovat tomu, aby se zabránilo kontaminaci reagensů i jiného laboratorního vybavení amplikony nebo DNA.

Doporučuje provádět negativní kontrolu s destilovanou vodou. V kontrole s destilovanou vodou nesmí být detekován žádný fluorescenční signál $Cq < 36$. Pokud se signál při negativní kontrole objeví, je nutno dekontaminovat pracovní prostor pro PCR od DNA a v případě potřeby vyměnit reagenty.

Veškeré přístroje (t.j. pipety, real-time cykléry) musí být kalibrovány podle pokynů výrobce.

11. Interní kontrola kvality

Interní kontrolu kvality nové šarže lze provést použitím kombinace vzorků DNA se známým genotypem. Vnitřní amplifikační kontrola (IAC) pro kontrolu správné amplifikace je obsažena ve vysušeném oligomixu.

Doporučujeme provádění negativní kontroly, aby byla detekována případná kontaminace. Pro tento účel připravte test bez DNA (NTC), viz kapitola 6.3. Amplifikace.

12. Řešení problémů






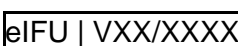












Projev	Možná příčina	Možné/á řešení
Špatný nebo žádný signál	Přítomnost inhibitoru.	Použijte čisté reagensy.
	V reakci není žádná gDNA.	Zopakujte test. Dbejte na správné pipetování.
	Špatné parametry amplifikace.	Zkontrolujte program PCR a ramp rate.
	Kontaminovaná nebo degradovaná DNA.	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu DNA. Zkontrolujte DNA na gelu. Zopakujte izolaci DNA.
	Fluorescenční próby nebo primery jsou degradovány.	Použijte novou ERY Q soupravu. Zabraňte osvětlení a častému zamrazování a rozmrazování. Zkontrolujte podmínky skladování.
	Bublinky v PCR reakčních zkumavkách / zbytky roztoku na vnitřních stěnách zkumavky.	Pečlivě pipetujte.
Vypaření reagensů díky nesprávnému uzavření reagenčních zkumavek.	Ujistěte se, že zkumavky jsou správně uzavřeny. Dbejte, aby kraje přelepovací fólie správně přilnuly.	
Signál v negativní kontrole	DNA kontaminace negativní kontroly	Zopakujte negativní kontrolu.

13. Ochranné známky použité v tomto dokumentu a na výrobku:

TaqMan® je obchodní jméno Roche Molecular Systems Inc.

® Cal Fluor & Quasar Dyes jsou registrované obchodní značky firmy LGC Biosearch Technologies

14. Vysvětlení symbolů na etiketách

	Dostatečné pro n testů
	Teplota skladování / Omezení teploty
	Viz návod k použití
	Spotřebujte do
	Výrobce
	Návod k použití v elektronické podobě Verze aktuálního návodu k použití
	Pouze pro IN VITRO použití
	Číslo šarže
	Obsah, obsahuje
	Zamýšlené použití: typizace krevních skupin
	Zamýšlené použití: detekce specifit HNA
	Zamýšlené použití: detekce specifit HPA
	Katalogové číslo
	PCR stripy
	Reakční mixy
	PCR víčka
	Připraveno k použití
	Mastermix, obsahuje dNTPs, Taq polymerázu, reakční pufr

15. Literatura

1. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

Návody k použití v jiných jazycích a další informace na: <http://www.bag-diagnostics.com> nebo přímo na info@bag-diagnostics.com