

DE

Gebrauchsinformation

ERY Q[®] Kits

CE IVD

| | | |
|-----|--------|--------------------------------|
| REF | 728401 | ERY Q [®] Weak D |
| REF | 728402 | ERY Q [®] HPA |
| REF | 728403 | ERY Q [®] Partial D |
| REF | 728404 | ERY Q [®] HNA |
| REF | 728405 | ERY Q [®] RH |
| REF | 728406 | ERY Q [®] ABO |
| REF | 728407 | ERY Q [®] KKD/MNS |
| REF | 728408 | ERY Q [®] Rare |
| REF | 728409 | ERY Q [®] ABO variant |

Inhalt

| | |
|---|----|
| 1. Zweckbestimmung | 2 |
| 2. Produktbeschreibung | 2 |
| 3. Testprinzip | 2 |
| 4. Material | 3 |
| 4.1 Inhalt der Kits | 3 |
| 4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte | 3 |
| 4.3 Validierte RT-PCR Cycler | 3 |
| 5. Lagerung und Haltbarkeit | 3 |
| 6. Testdurchführung | 4 |
| 6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise | 4 |
| 6.2 DNA Isolation | 4 |
| 6.3 Eingabe von Probeninformationen in die PlexTyper [®] Software | 4 |
| 6.4 PCR Setup | 5 |
| 6.5 Setup der RT-PCR Cycler | 6 |
| 6.5.1 CFX96 Touch [™] Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad | 6 |
| 6.5.2 LightCycler [®] 480 II Real-Time PCR Detection System, Roche Molecular Systems Inc. | 7 |
| 6.5.3 QuantStudio [™] 6 Flex System | 8 |
| 6.6 Export der Ergebnisse | 9 |
| 6.6.1 CFX96 Touch [™] Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad | 9 |
| 6.6.2 LightCycler [®] 480 II Real-Time PCR Detection System, Roche Molecular Systems Inc. | 10 |
| 6.6.3 QuantStudio [™] 6 Flex System, Applied Biosystems | 10 |
| 6.7 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse | 11 |
| 7. Warn- und Entsorgungshinweise | 11 |
| 8. Kitspezifitäten | 12 |
| 9. Leistungsbewertung | 14 |
| 9.1 Kreuzreaktive Substanzen | 16 |
| 10. Grenzen der Methode | 16 |
| 11. Interne Qualitätskontrolle | 17 |
| 12. Problembehandlung | 17 |
| 13. Verwendete Markennamen | 17 |
| 15. Literatur | 18 |

Version: 06/2021 / Stand: 2021-08 Änderungen zu Version 05/2021 sind gelb markiert.

1. Zweckbestimmung

Die ERY Q® Kits sind In-vitro-Diagnostika zur Anwendung durch Fachpersonal in spezialisierten Laboren.

Die ERY Q® RH, -Partial D, -Weak D, -ABO, -ABO variant und KKD/MNS Kits sind bestimmt zur Zweitbestimmung von Blutgruppenmerkmalen anhand genomischer DNA-Proben von Spendern, Empfängern und Schwangeren. Die Zweittypisierung erfolgt auf molekulargenetischer Basis mit Hilfe der SSP PCR-Technik und Echtzeit-Nachweis (Realtime-PCR) der Amplifikate.

Die ERY Q® RH, -Partial D, -Weak D, -ABO und -ABO variant Kits dürfen ausschließlich zur Zweitbestimmung der genannten Merkmale verwendet werden. Sie dienen zur Ergänzung und Bestätigung serologischer Vorbefunde bei diskrepanten oder zweifelhaften Typisierungsergebnissen. Dies gilt in gleicher Weise für die Bestimmung von Kell- (K), Kidd- (K) und Duffy- (D) Merkmalen. Das Testsystem darf zur Bestimmung der KKD Merkmale ausschließlich zur Zweitbestimmung eingesetzt werden.

Die ERY Q® HPA, -HNA und -Rare Kits sind bestimmt zur Typisierung von Blutgruppen-, Thrombozyten- und Granulozytenmerkmalen anhand genomischer DNA-Proben von Spendern, Empfängern und Schwangeren. Die Typisierung erfolgt auf molekulargenetischer Basis mit Hilfe der SSP PCR-Technik und Echtzeit-Nachweis (Realtime-PCR) der Amplifikate.

Für die Bestimmung der MNS Merkmale durch das ERY Q® KKD/MNS Kit sowie zur Genotypisierung der -HNA, -HPA und seltenen Blutgruppenmerkmalen mit den ERY Q® HPA, -HNA und -Rare Kits ist ein serologischer Erstbefund nicht zwingend Voraussetzung.

2. Produktbeschreibung

Die ERY Q® Kits werden zur molekulargenetischen Zweitbestimmung / Bestimmung von Blutgruppen-, Thrombozyten- und Granulozytenmerkmalen eingesetzt. Es werden alle klinisch relevanten Allele erfasst, siehe Kapitel 8 - Kitspezifitäten. Die ERY Q® Typisierungskits enthalten alle für die PCR Reaktion benötigten Komponenten. Die Auswertung erfolgt mit der PlexTyper®-Software.

3. 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 von Abschnitten spezifischer Allele oder Allelgruppen entwickelt. Die Amplifikate werden mit ebenfalls genortspezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Hydrolyse-Sonden (TaqMan®-Sonden) nachgewiesen (Realtime-PCR; RT-PCR), wodurch die Sensitivität und Spezifität des Tests im Vergleich zur klassischen gelbasierten SSP erhöht wird.

Wenn Amplifikate vorhanden sind, werden die Sonden durch die Taq Polymerase hydrolysiert 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.

In der Multiplex-PCR Reaktion ist auch eine interne Amplifikationskontrolle (humanes HGH Gen) enthalten, die in einem anderen Farbkanal als die spezifischen Reaktionen nachgewiesen wird.

4. Material

4.1 Inhalt der Kits

- **Plex Mix**, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer
- **ERY Q® 8-Well PCR Streifen** mit vorgetropften und getrockneten Reaktionsansätzen, die spezifische Primer und Sonden sowie HGH-spezifische Kontrollprimer und Sonden (Oligomixe) enthalten.
- **PCR Deckel (á 8)**

Der Plex Mix ist als IVD Zubehör auch separat erhältlich (REF 728298). Der Plex Mix darf nur für die in der Gebrauchsinformation Plex Mix angegebenen BAG-Produkte verwendet werden.

4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- Reagenzien zur DNA Isolation (validierte Extraktionskits siehe 6.2)
- RT-PCR-Cycler (validierte Cycler s. 4.3)
- Aqua dest.
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen
- Platten-Zentrifuge

Platten/Streifen Adapter:

- Für LightCycler® 480 II: Vari-Plate™ 96 Well Semi-Skirted Frame, Roche Style (Fa. Brooks Life Science (4titude), Bestell-Nr. 4ti-0950W-F) oder LightCycler® 8-Tube-Strip Adapter Plate (Fa. Roche, Bestell-Nr. 06612598001)
- Für QuantStudio™ 6 Flex System: Fast 96 Well Plate Adapter (Standardzubehör, Bestell-Nr. 4459846 für Ersatzteil bei Fa. ThermoFischer (Applied Biosystems))

4.3 Validierte RT-PCR Cycler

Die folgenden Cycler sind für die ERY Q® Kits validiert:

- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad
- LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System, Roche Molecular Systems Inc.
- QuantStudio™ 6 Flex System, Applied Biosystems

5. Lagerung und Haltbarkeit

Alle Reagenzien müssen bei ≤ -20°C in temperaturüberwachten Geräten gelagert werden. Der Transport erfolgt **mit Trockeneis**. 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 des Plex Mixes hat ergeben, dass bis zu 12 Zyklen keinen nachteiligen Effekt auf die Qualität haben. Es wird empfohlen, den Plex Mix ggf. zu aliquotieren.

6. Testdurchführung

6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Molekulargenetische Techniken sind besonders sensitive Methoden und sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal mit Erfahrung in molekulargenetischen Techniken durchgeführt 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
- ◆ zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Detektion); möglichst zwei getrennte Räume nutzen
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen

6.2 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 (1), derartige Abnahmesysteme sind daher nicht geeignet und dürfen nicht verwendet werden.

Validierte DNA Extraktionskits:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (Säulen)

Sowohl die manuelle Isolation als auch die automatisierte DNA Isolation (QIAcube) ist validiert.

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

Die Reinheitsindices müssen sich im folgenden Bereich befinden:

- $OD_{260} / OD_{280} = > 1,5 \text{ und } < 2,0$
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.

6.3 Eingabe von Probeninformationen in die PlexTyper® Software

Es ist zwingend erforderlich, die PlexTyper® Software zur Auswertung der ERY Q® Daten zu verwenden. Es ist ratsam, die Probeninformationen und den Test-Setup vor der PCR-Amplifikation in PlexTyper® einzugeben, um die eindeutige RUN ID zu erhalten. Ausführliche Informationen über die PlexTyper® Software finden Sie in der Gebrauchsanweisung der PlexTyper® Software auf unserer Website <http://www.bag-diagnostics.com>.

6.4 PCR Setup

Hinweis:

- Das Reaktionsvolumen für jeden RT-PCR-Ansatz beträgt 10 µl (pro Well).
- Für den Test ist eine DNA-Ausgangskonzentration von 10 - 30 ng/µl erforderlich.

Pipettiervorgang:

Die Oberseite der Streifen ist durch den Aufdruck der Charge markiert, das heißt in dem Gefäß unter dem Chargenaufdruck befindet sich Mix 1. Auf die Orientierung der Streifen ist zu achten, besonders beim Bestücken des Cyclers.

Für ein Well werden 2 µl Plex Mix, 1 µl Proben DNA und 7 µl Aqua dest. in das Reaktionsgefäß pipettiert.

Für jede Probe (8 Well Streifen) wird ein Prä-Mix angesetzt (ein 9-fach Ansatz wird empfohlen):

18 µl Plex Mix
9 µl Proben DNA
63 µl Aqua dest.

Achtung: Für jede Probe des **ERY Q® ABO variant** Kits (2 x 8 Well Streifen, die hinter dem Chargendruck mit 1 und 2 markiert sind) wird ein Prä-Mix angesetzt (ein 18-fach Ansatz wird empfohlen):

36 µl Plex Mix
18 µl Proben DNA
126 µl Aqua dest.

Aus diesem Prä-Mix werden in jedes der 8 Wells (oder 16 Wells) 10 µl pipettiert.

Für eine **Negativkontrolle (NTC)** wird ein Test mit Aqua dest. anstatt der Proben-DNA angesetzt.

Hinweis: Während des Pipettierens, den Kontakt der Pipettenspitze mit den vorgetrockneten Mixen am Boden der Wells vermeiden. Es wird empfohlen an den Rand des Wells zu pipettieren, siehe Abbildung 1.

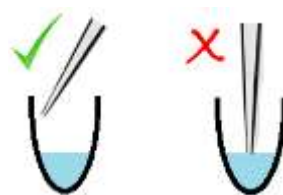


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Pipettiervorgangs

Die Reaktionsgefäße verschließen und die Flüssigkeit **kurz herunterzentrifugieren**. Sicherstellen, dass die Streifen durch die Deckel **vollständig verschlossen** sind und sich **keine Blasen** in den Reaktionsgefäßen befinden. Wenn Blasen auftreten, die Gefäße vorsichtig auf den Labortisch klopfen, um diese zu entfernen. Anschließend die PCR-Reaktion durchführen.

Hinweis: Andere als die unter Punkt 4.3 aufgeführten Thermocycler sind nicht validiert und benötigen möglicherweise andere PCR Einstellungen. Die PlexTyper® Software ist für die Auswertung der Ergebnisse essentiell und die Software kann nur Daten von validierten Geräten importieren.

6.5 Setup der RT-PCR Cycler

Folgende Fluorophore werden bei der ERY Q® Produktlinie eingesetzt.

| Fluorophor | Wave length in nm |
|-----------------------|----------------------------------|
| FAM | Excitation: 495 Emission: 520 |
| CAL Fluor® Orange 560 | Excitation: 538 Emission: 559 |
| CAL Fluor® Red 610 | Excitation: 590 Emission: 610 |
| Quasar® 670 | Excitation: 647 Emission: 670 |

6.5.1 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad

Hinweis: Die Namen der Farben dürfen in der CFX Software nicht geändert werden. Die PlexTyper® Software benötigt die Standardnamen für die Auswertung und den korrekten Import.

Tabelle: PCR-Programm

| Programm-Schritt | Zeit [s] | Temperatur [°C] | Ramp rate [°C/s] | Plate read | Anzahl Zyklen |
|-----------------------|----------|-----------------|------------------|------------|---------------|
| Initiale Aktivierung | 120 | 96 | 2,5 | - | 1 |
| Denaturierung | 5 | 98 | 2,5 | - | 13 |
| Annealing + Extension | 25 | 68 | 2,2 | - | |
| Denaturierung | 5 | 98 | 2,5 | - | 37 |
| Annealing + Extension | 25 | 68 | - | ja | |

Hinweis: Beim CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System ist eine **veränderte Heizrate** des Geräts (Ramp rate) zu verwenden. Diese ist in der obigen Tabelle mit dem PCR-Programm (Spalte „Ramp rate“) aufgelistet. Vor dem Start des Laufs muss ein Haken bei „**All Channels**“ gesetzt werden und die Deckeltemperatur muss auf 105°C eingestellt sein.

6.5.2 LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System, Roche Molecular Systems Inc.

Bitte beachten Sie, dass die Lichtquelle für diesen Cycler geändert wurde. Ab Seriennummer 29001 ist es eine LED-Lampe, vorher war es eine Xenon-Lampe. Der Test wurde auf einem Gerät mit einer LED-Lampe validiert. Es wird erwartet, dass die älteren Versionen ebenfalls mit dem Test kompatibel sind, aber es ist wahrscheinlich, dass eine Farbkompensation notwendig ist. Bitte kontaktieren Sie BAG Diagnostics, wenn Sie ein Gerät mit einer Xenon-Lampe haben und Ihre Ergebnisse suboptimal sind.

Hinweis:

- Bei dem Lightcycler 480 II ist es zwingend notwendig alle leeren Kavitäten auf dem Heizblock mit Dummy-Streifen voll zu belegen.
- Für die ERY Q®-Streifen wird eine spezielle Halterung für den Lightcycler 480 II benötigt: Vari-Plate™ 96 Well Semi-Skirted Frame, Roche Style oder LightCycler® 8-Tube-Strip Adapter Plate (siehe Punkt 4.2).

Für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte BAG Diagnostics.

PCR-Programm

Erstellen und speichern Sie gemäß der Bedienungsanleitung des LightCycler 480 II ein PCR-Protokoll mit den folgenden Parametern:

Detection Format: ERY Q®, Block size 96, Reaction volume 10µl

| Step | Cycles | Analysis Mode | Target (°C) | Acquisition Mode | Hold (hh:mm:ss) | Ramp rate (°C/s) |
|-------|--------|----------------|-------------|------------------|-----------------|------------------|
| Hold | 1 | None | 96 | None | 00:02:00 | 2.5 |
| Cycle | 13 | None | 98 | None | 00:00:05 | 2.5 |
| | | | 68 | None | 00:00:25 | 2.2 |
| Cycle | 37 | Quantification | 98 | None | 00:00:05 | 2.5 |
| | | | 68 | Single | 00:00:25 | 2.2 |

Kanäle für das LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System

Verwenden Sie die folgende Kanaleinstellung:

| Excitation | Emission | | | | | |
|------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 488 | 510 | 580 | 610 | 640 | 660 |
| 440 | | | | | | |
| 465 | | ✓ | | | | |
| 498 | | | | | | |
| 533 | | | ✓ | ✓ | | |
| 618 | | | | | | ✓ |

| Excitation Filter | Emission Filter | Name | Melt Factor | Quant Factor | Max Integration Time (Sec) |
|-------------------|-----------------|------------------------------|-------------|--------------|----------------------------|
| 465 | 510 | FAM | 1 | 10 | 1 |
| 533 | 580 | O560 (CalFluor Orange560) | 1 | 10 | 1 |
| 533 | 610 | R610 (CalFluor Red610) | 1 | 10 | 1 |
| 618 | 660 | Q670 (Quasar670) | 1 | 10 | 1 |

Es ist nicht notwendig, die Farbkompensationsfunktion im LightCycler-Programm zu nutzen, da die PlexTyper® Software diese Berechnungen während der Analyse durchführt.

Geräteeinstellungen für den Plattentyp: White Plates

6.5.3 QuantStudio™ 6 Flex System

Hinweis: Für die ERY Q®-Streifen wird eine spezielle Halterung für das QuantStudio™ 6 Flex System benötigt: Fast 96 Well Plate Adapter (siehe Punkt 4.2).
Für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte BAG Diagnostics.

Experiment-Eigenschaften:

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| Instrument type: | QuantStudio™ 6 Flex System |
| Block type: | Fast 96-Well (0.1mL) |
| Experiment type: | Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$) |
| Reagent type: | TaqMan® Reagents |
| Run properties: | Standard |

Bitte beachten Sie: Es muss eine Farbstoffkalibrierung durchgeführt werden!

Targets definieren:

| Target Name | Reporter | Quencher | Color |
|-------------|----------|----------|--------|
| FAM | FAM | NFQ-MGB | Green |
| Orange560 | O560 | NFQ-MGB | Orange |
| RED | R610 | NFQ-MGB | Red |
| Q670 | Q670 | NFQ-MGB | Purple |

Passive Referenz: None

Zuweisung: Assign all targets to each well.

Run Method:

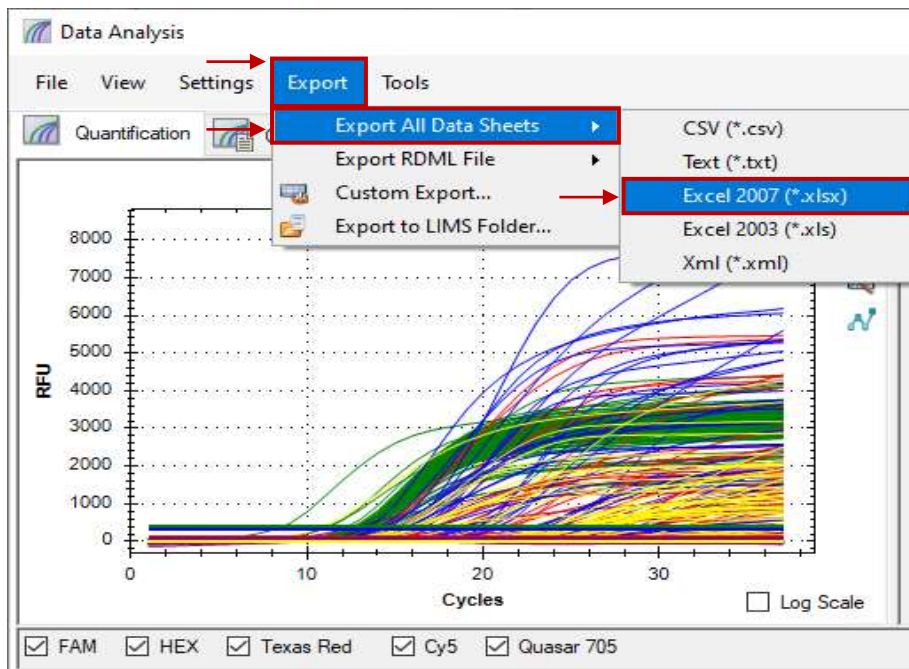
Reaktionsvolumen: 10 µl

| Stage | Cycles | Data Collection | Target (°C) | Hold (mm:ss) | Ramp rate (°C/s) |
|------------|--------|-----------------|-------------|--------------|------------------|
| Hold Stage | 1 | Off | 96 | 00:02:00 | 2.5 |
| PCR Stage | 13 | Off | 98 | 00:00:05 | 2.5 |
| | | | 68 | 00:00:25 | 2.2 |
| PCR Stage | 37 | Off | 98 | 00:00:05 | 2.5 |
| | | | On | 68 | 00:00:25 |

6.6 Export der Ergebnisse

6.6.1 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad

Öffnen Sie die Daten mit der CFX-Software und exportieren Sie dann die Excel 2007-Datei (.xlsx).



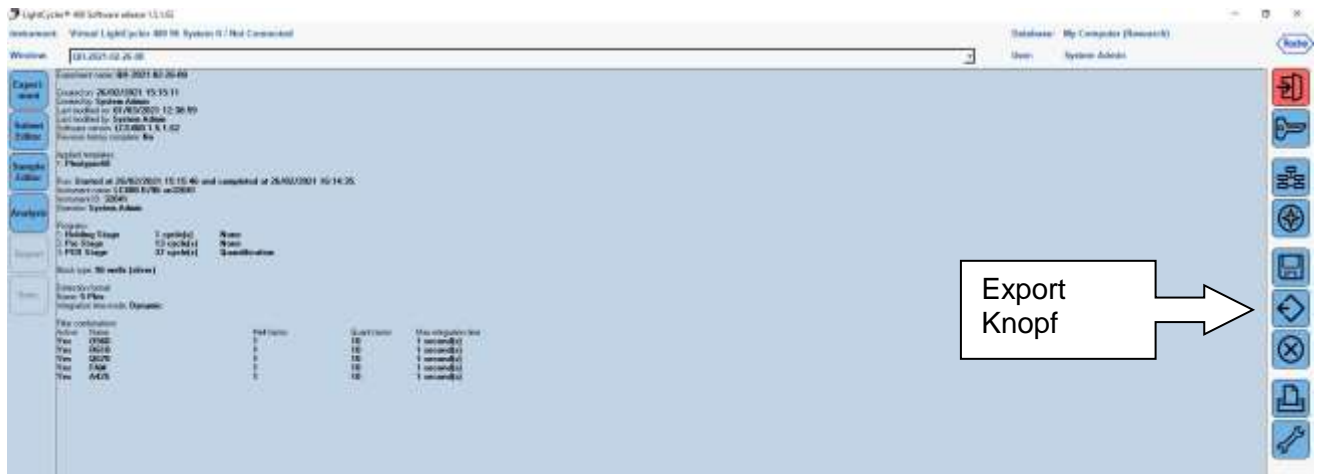
- Allelic Discrimination Results
- ANOVA Results
- End Point Results
- Melt Curve Plate View Results
- Quantification Amplification Results
- Quantification Cq Results
- Quantification Plate View Results
- Quantification Summary
- Standard Curve Results

Hinweis

Es wird nur die Datei "Quantification Amplification Results" benötigt. Es ist sinnvoll, die anderen Dateien zu löschen.

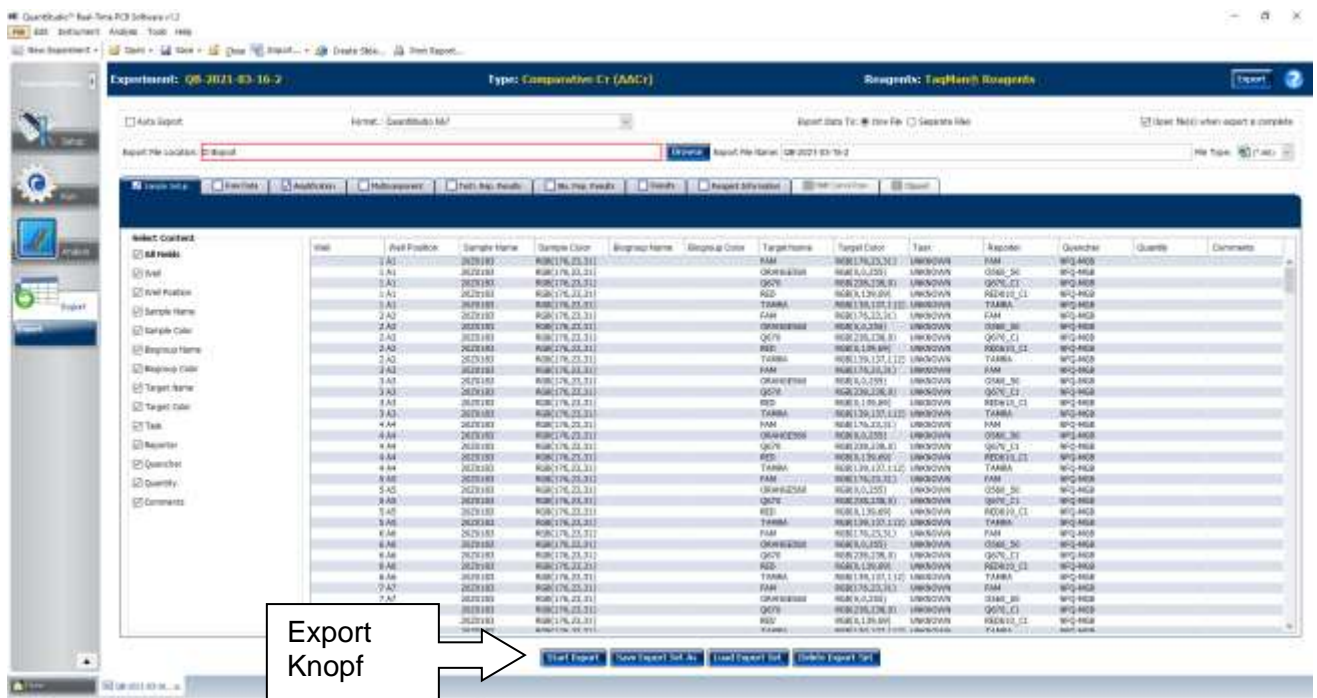
6.6.2 LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System, Roche Molecular Systems Inc.

PlexTyper® verwendet xml-Dateien von dem LightCycler® 480 II. Nach Abschluss des Laufs ist keine Analyse in der Roche-Software erforderlich. Exportieren Sie die Rohdaten in XML-Form.



6.6.3 QuantStudio™ 6 Flex System, Applied Biosystems

Öffnen Sie das Export-Menü und starten Sie den Export des "Sample Setup" und der Registerkarte "Amplification" als (*.xls)-Datei.



6.7 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Für die Auswertung und Interpretation der Daten ist die PlexTyper® Software (kostenlos bei BAG Diagnostics erhältlich) in Verbindung mit den PlexTyper® spezifischen Kit Files erforderlich.

Die zur Auswertung benötigten Kit Files stehen zum Herunterladen auf dem Download Server (www.service.bag-diagnostics.com) zur Verfügung.

Produkt und Lotnummer des benutzten Kits notieren. Die Kit Files sind produkt- und lotspezifisch und auch spezifisch für den verwendeten RT-PCR-Cycler. Der Gebrauch von falschen Kit Files (falsches Kit, falsche Lot, falscher Cycler) kann zur inkorrekten Genotypisierung führen.

Zur Auswertung der Ergebnisse müssen die Daten vom Thermocycler auf einen Computer mit der PlexTyper® Software übertragen werden (z. B. mit einem passenden USB Stick). Bitte zur Auswertung der Daten die PlexTyper® Gebrauchsinformation beachten.

Es ist möglich, aber nicht notwendig, die Daten generell in der Thermocycler Software zu überprüfen. Zum Beispiel müssen valide Testansätze ausreichende Fluoreszenzsignale im FAM-Kanal der internen Kontrolle aufweisen. Positive Reaktionen zeigen ein positives Farbsignal im korrespondierenden Farbkanal.

Eine Negativkontrolle (NTC) dient als Kontaminationskontrolle. Wenn DNA oder kontaminierende Amplifikate unbeabsichtigt in die NTC Reaktion hinzugefügt werden, führt dies zu einem positiven Signal. Liegt der Cq unter 36 wird dies von der PlexTyper® Software als mögliche Kontamination erkannt und ein Warnhinweis wird erstellt. Amplifikationssignale mit einem höheren Cq als 36 in der NTC werden als PCR Artefakte angesehen und nicht berücksichtigt. Wird eine PCR Kontamination vermutet, wird empfohlen den PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

Die von der cycler-spezifischen Software ermittelten Rohdaten werden in die PlexTyper® Software importiert. Die PlexTyper® Software ermittelt anhand der Cq Werte, RFUs (Relative Fluorescence Units) und dem Kurvenverlauf die positiven und negativen Reaktionen, aus denen die molekulargenetischen Blutgruppenmerkmale oder die HPA- bzw. HNA-Merkmale der eingesetzten Proben bestimmt werden.

7. Warn- und Entsorgungshinweise

Das Kit 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 muss entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Eine 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.

Für den Plex Mix gilt folgende Gefahrstoffkennzeichnung:

Symbol: Warnung



Gefahrenhinweise

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Sicherheitshinweise

P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.

P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.

P103 Lesen Sie sämtliche Anweisungen aufmerksam und befolgen Sie diese.

P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen.

P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P501 Inhalt/Behälter gemäß lokalen/nationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

Ein Sicherheitsdatenblatt für den Plex Mix kann unter www.bag-diagnostics.com heruntergeladen werden. Weitere Sicherheitsdatenblätter gemäß Artikel 31 der REACH-Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 sowie der Verordnung EG Nr. 1272/2008 sind nicht erforderlich.

8. Kitspezifitäten

Die für das jeweilige ERY Q® Kit gewählte Kombination der Primer und Sonden ermöglicht die Erkennung der unten aufgeführten Spezifitäten. Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität der Testkits wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekanntem Genotyp überprüft.

| Produkt | Spezifitäten |
|--------------------------|--|
| ERY Q® HPA REF 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 |

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

| Produkt | Spezifitäten | |
|----------------------------------|---|---|
| ERY Q® ABO REF 728406 | ABO* A1.01 ABO* A2.01 ABO* B.01 ABO* O.01.01 ABO* O.02.01 | |
| ERY Q® ABO variant REF 728409 | ABO* A1.01 ABO* A2.01 ABO* A3.01 ABO* AEL.01 ABO* AW.04 ABO* AW.06 ABO* AW.07 ABO* AW.11 ABO* AW.30.01 ABO* cisAB.01 | ABO* B.01 ABO* B3.02 ABO* BW.01 ABO* BW.09 ABO* O.01.01 ABO* O.01.02 ABO* O.02.01 ABO* O.01.57 ABO* O.04.01 ABO* O.04.02 |
| ERY Q® KKD/MNS REF 728407 | KEL*01.01 KEL*02 JK*01 JK*02 JK*01N.06# JK*02N.06# FY*01 FY*02 | GYPA*01 GYPA*02 GYPB*03 GYPB*04 GYPB*03N.01# GYPB*03N.04# FY*02W.01 FY*02N.01 |
| ERY Q® Rare REF 728408 | KEL*02.03 KEL*02.04 KEL*02.06 KEL*02.07 DI*01 DI*02 DI*02.03# DI*02.04 DO*01 DO*02 | LU*01 LU*02 CO*01.01 CO*02 YT*01 YT*02 VEL*01 VEL*-01 KN*01 KN*02 |

Diese Spezifitäten konnten auf Grund der Seltenheit nicht positiv getestet werden.

9. Leistungsbewertung

Für die ERY Q® HPA, HNA, RH, Weak D, Partial D, ABO, ABO variant, KKD/MNS und Rare Kits wurden Leistungsstudien mit vortypisierten DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Typisierungen wurden mit den Resultaten, die mit CE-zertifizierten Typisierungsreagenzien (z.B. SSP, Serologie) und der Nukleinsäuresequenzierung erzielt wurden, verglichen.

Wenn keine DNA-Proben für seltene Allele zur Verfügung standen, wurden diese durch synthetisch hergestellte DNA-Proben ersetzt und die Mixe so auf ihre Reaktivität geprüft.

Für die Produkte wurden externe und interne Leistungsbewertungsstudien in verschiedenen Blutspende-Einrichtungen, medizinischen Laboren sowie in der BAG von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt. Die Typisierungen mit den ERY Q® Kits ergaben folgende Übereinstimmung mit den Vortypisierungsergebnissen.

| Kit | Anzahl getesteter Proben mit dem Bio Rad CFX Cyclcr | Übereinstimmung zur Referenztypisierung |
|--------------------|---|---|
| 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 % |
| ERY Q® ABO | 92 | 100 % |
| ERY Q® ABO variant | 116 | 100 % |
| ERY Q® KKD/MNS | 82 | *96,3 % |
| ERY Q® Rare | 87 | *97,7 % |

* Kein eindeutiges Sequenzierergebnis der Referenzproben.

| Kit | Anzahl getesteter Proben mit dem LightCycler® 480 II | Anzahl getesteter Proben mit dem QuantStudio™ 6 Flex System | Übereinstimmung zur Referenztypisierung |
|---------------------------------|--|---|---|
| ERY Q® HPA | 10 | 12 | 100% |
| ERY Q® HNA | 8 | 12 | 100% |
| ERY Q® RH | 15 | 12 | 100% |
| ERY Q® Weak D | 15 | 10 | 100% |
| ERY Q® Partial D | 11 | 6 | 100% |
| ERY Q® ABO / ERY Q® ABO variant | 14 | 12 | 100% |
| ERY Q® KKD/MNS | 3 | 10 | 100% |
| ERY Q® Rare | 11 | 12 | 100% |

Die Spezifität der Kits kann aus der CFX-Validierung abgeleitet werden, daher ist für die Validierung weiterer Cyclcr eine geringere Anzahl an Proben ausreichend.

9.1 Kreuzreaktive Substanzen

Acht Substanzen, die den Assay stören könnten, wurden getestet, und es zeigte sich, dass die folgenden Konzentrationen keinen nachteiligen Einfluss auf die Ergebnisse haben:

| Substanz | Maximale nicht-inhibitorische Konzentration |
|---|---|
| Protein (BSA) | 0,2 mg/ml |
| TE (Tris/EDTA, pH 8.0) | 7 mM Tris, 0,7 mM EDTA |
| NaCl | 20 mM |
| Ethanol | 1% |
| Haemoglobin | 0,01 mg/ml |
| Sodium Citrate | 7 mM |
| DNA extraction buffer 1 (Qiagen QIAamp DNA Blood Kits) | 1% |
| DNA extraction buffer 2 (Qiagen QIAamp DNA Blood Kits) | 2% |

10. Grenzen der Methode

Sollte kein eindeutiges Ergebnis mit den ERY Q® Kits erzielt werden (z.B. durch bis jetzt unbekannte Allele, die mit den vorhandenen Primern bzw. Sonden nicht erfasst werden), sind die Transfusionsrichtlinien (z.B. Richtlinien der Bundesärztekammer) entsprechend den serologischen Befunden zu beachten. Eine Sequenzierung solcher Proben zur Abklärung des Genotyps wird empfohlen. Die Testergebnisse sind mit Berücksichtigung der genetischen Varianz unterschiedlicher ethnischer Gruppen zu bewerten. Im Zweifelsfalle gilt der Phänotyp.

Da das RT-PCR Verfahren sehr empfindlich auf Kreuz-Kontaminationen mit DNA reagiert, ist bei der Isolation hierauf zu achten. Es sollte besonders darauf geachtet werden, Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplikons oder DNA zu vermeiden.

Zur Vermeidung von falsch positiven und negativen Reaktionen auf Grund von Kontaminationen, wird auf die Mitführung einer Negativkontrolle mit Aqua dest. dringend hingewiesen. In der Negativkontrolle mit Aqua dest. darf kein Fluoreszenzsignal unterhalb dem Cq von 36 nachgewiesen werden. Im Fall einer Signalentwicklung in der Negativkontrolle ist ggf. 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.

11. Interne Qualitätskontrolle

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots können mit einer Kombination von DNA Proben mit bekannten Genotypen durchgeführt werden. Eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation ist in den getrockneten Oligomixen enthalten.

Zur Vermeidung von falsch positiven und negativen Reaktionen, auf Grund von Kontaminationen, wird auf die Mitführung einer Negativkontrolle mit Aqua dest. dringend hingewiesen. Zu diesem Zweck wird ein Test ohne DNA angesetzt (NTC), siehe Punkt 6.4 PCR Setup.

12. Problembehandlung











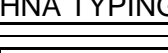




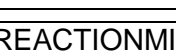





| Fehler | mögliche Ursache | mögliche Lösung |
|------------------------------------|--|--|
| Schlechtes bzw. kein Signal | Vorhandensein eines Inhibitors. | Frische Reagenzien verwenden. |
| | Keine gDNA im Reaktionsansatz. | Test wiederholen. Auf richtiges Pipettieren achten. |
| | Falsche Amplifikationsparameter. | 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 ERY Q® Kit verwenden. Lichtexposition sowie häufiges Einfrieren/Auftauen vermeiden. Lagerungsbedingungen beachten! |
| | Bläschen im Reaktionsansatz / Restflüssigkeit an der Innenwand. | Vorsichtiges Pipettieren. Abzentrifugieren der PCR Platte. |
| | Verdunstung der Reagenzien durch unsachgemäßes Verschließen der PCR- Gefäße. | Prüfung auf korrektes Verschließen. Vorsicht bei Klebefolien im Randbereich. |
| Signal in Negativkontrolle | Kontamination mit DNA. | Wiederholung der Negativkontrolle. Wenn wieder ein Signal nachgewiesen wird, Dekontamination des Arbeitsplatzes und Testwiederholung. |

13. Verwendete Markennamen

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

® Cal Fluor & Quasar Dyes sind registrierte Markennamen der Firma LGC Biosearch Technologies

14. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

| | |
|---|--|
|  | Ausreichend für n Tests |
|  | Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert |
|  | Gebrauchsinformation beachten |
|  | Verwendbar bis |
|  | Hersteller |
|  | Elektronische Gebrauchsinformation Version der aktuellen Gebrauchsinformation |
|  | In-vitro-Diagnostikum |
|  | Lot-Nr. |
|  | Inhalt, enthält |
|  | Zur Blutgruppenbestimmung entsprechend der Zweckbestimmung |
|  | Zur Bestimmung der HNA-Merkmale |
|  | Zur Bestimmung der HPA-Merkmale |
|  | Bestell-Nr. |
|  | PCR-Streifen |
|  | PCR-Streifen 1 für Mixe 1-8 von ERY Q® AB0 variant |
|  | PCR-Streifen 2 für Mixe 9-16 von ERY Q® AB0 variant |
|  | Reaktionsmische |
|  | PCR-Deckel |
|  | Gebrauchsfertig |
|  | Mastermix, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer |
|  | Warnung (siehe Kapitel 7) |

15. Literatur

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

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website www.bag-diagnostics.com
oder kontaktieren Sie uns direkt über info@bag-diagnostics.com