

DE

Gebrauchsinformation

ERY Q Kits

CE IVD

Testkits zur Bestimmung von Blutgruppen-, HNA- und HPA-Merkmalen
auf molekulargenetischer Basis

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

Inhalt

1. Zweckbestimmung	2
2. Produktbeschreibung	2
3. Testprinzip	2
4. Material	2
4.1 Inhalt der Kits	2
4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte	3
4.3 Validierter Cycler	3
5. Lagerung und Haltbarkeit	3
6. Testdurchführung	3
6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	3
6.2 DNA Isolation	4
6.3 Amplifikation	4
6.4 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse	5
7. Warn- und Entsorgungshinweise	6
8. Kitspezifitäten	7
9. Leistungsbewertung	8
10. Grenzen der Methode	9
11. Interne Qualitätskontrolle	9
12. Problembehandlung	10
13. Verwendete Markennamen	10
15. Literatur	11

Version: 01/2020 / Stand: 2020-07

1. Zweckbestimmung

Die ERY Q Kits sind bestimmt zur Typisierung von Blutgruppen-, Thrombozyten- und Granulozytenmerkmalen anhand genomischer DNA-Proben von Spendern, Empfängern und Schwangeren. Sie sind zur Anwendung durch Fachpersonal in spezialisierten Laboren konzipiert. Die Typisierung erfolgt auf molekulargenetischer Basis mit Hilfe der SSP PCR-Technik und Echtzeit-Nachweis (Realtime-PCR) der Amplifikate.

Die ERY Q RH, -Partial D und -Weak D Kits sind ausschließlich zur Zweitbestimmung der RH-, Partial D- und Weak D-Merkmale vorgesehen. Sie dienen zur Ergänzung und Bestätigung serologischer Vorbefunde bei diskrepanten oder zweifelhaften Typisierungsergebnissen.

Für die Bestimmung der HPA- und HNA-Merkmale mit den ERY Q HPA und ERY Q HNA Kits ist ein serologischer Erstbefund nicht zwingend Voraussetzung.

2. Produktbeschreibung

Die ERY Q Kits werden zur molekulargenetischen 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

- **260 µl Plex Mix**, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer
- **12 x ERY Q 8-Well PCR Streifen** für den molekulargenetischen Nachweis von Blutgruppen-HPA- oder HNA-Allelen. Die vorgetropften und getrockneten Reaktionsansätze enthalten spezifische Primer und Sonden sowie HGH-spezifische Kontrollprimer und Sonden (Oligomixe).
- **12 x PCR Deckel (á 8)**

4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

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

4.3 Validierter Cycler

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

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

5. Lagerung und Haltbarkeit

Alle Reagenzien müssen bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ in temperaturüberwachten Geräten gelagert werden. Der Transport erfolgt mit Kühlelementen. 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 6 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.

Empfohlene DNA Extraktionskits:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (Säulen)

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

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:

- $OD_{260} / OD_{280} = > 1,5$ 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 Amplifikation

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:

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.

Aus diesem Prä-Mix werden in jedes der 8 Wells 10 µl pipettiert.

Wenn eine **Negativkontrolle (NTC)** mitgeführt werden soll, muss ein Test mit Aqua dest. anstatt der Proben-DNA angesetzt werden.

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.

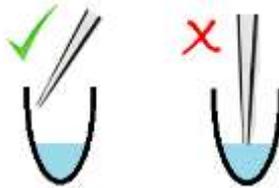


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Pipettiervorgangs

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 mit dem folgenden Programm durchführen.

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 PCR-Programm (Spalte „Ramp rate“) aufgelistet.

Andere 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.

6.4 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. Der Gebrauch von falschen Kit Files 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 aus der cyclerspezifischen 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.

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 heruntergeladen werden.

8. Kitspezifitäten

Die Kombination der Primer und Sonden ermöglicht eine Bestimmung der humanen Blutgruppen-, HNA- oder HPA-Allele entsprechend der kitspezifischen Angaben. Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität der Testkits wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekanntem Genotyp überprüft.

Produkt	Nachweis folgender Blutgruppen-, HNA- und HPA-Merkmale	
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	
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

Produkt	Nachweis folgender Blutgruppen-, HNA- und HPA-Merkmale	
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

9. Leistungsbewertung

Für die ERY Q HPA, HNA, RH, Weak D und Partial D 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	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%

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.

Die Mitführung einer Negativkontrolle mit Aqua dest. wird empfohlen. 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.

Die Mitführung von Negativkontrollen zum Nachweis möglicher Kontaminationen wird empfohlen. Zu diesem Zweck wird ein Test ohne DNA angesetzt (NTC), siehe Punkt 6.3 Amplifikation.

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 der Negativkontrolle mit DNA.	Wiederholung der Negativkontrolle. Dekontamination des Arbeitsplatzes.

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
	Zweckbestimmung: Blutgruppenbestimmung
	Zweckbestimmung: Bestimmung der HNA-Merkmale
	Zweckbestimmung: Bestimmung der HPA-Merkmale
	Bestell-Nr.
	PCR-Streifen
	Reaktionsmische
	PCR-Deckel
	Gebrauchsfertig
	Mastermix, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer

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