

IT

Istruzioni per l'uso

Weak D-TYPE 1-2-3 Q

Per le istruzioni d'uso in formato elettronico si consulti www.bag-diagnostics.com

CE IVD

Kit per test per la seconda determinazione di alleli
RHD*01W.1, *01W.1.1, *01W.2 e *01W.3 in biologia molecolare

Pronto all'uso

REF 728400

Versione: 01/2019 / Edita il: 2019-06

Indice

1.	DESCRIZIONE DEL PRODOTTO.....	2
2.	PRINCIPIO DEL TEST	2
3.1	Contenuto del kit Weak D-TYPE 1-2-3 Q	2
3.2	Reagenti e dispositivi aggiuntivi	2
3.3	Raccomandazioni riguardo ai termociclatori e provette di reazione validati	3
4.	CONSERVAZIONE E STABILITA'	3
5.	PROCEDIMENTO DEL TEST	3
5.1	Precauzioni di sicurezza ed avvertenze speciali	3
5.2	Estrazione del DNA.....	3
5.3	Amplificazione.....	4
5.4	Interpretazione dei risultati	5
6.	AVVERTENZE E PRECAUZIONI	7
7.	CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	7
8.	LIMITI DEL METODO	8
9.	CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO	8
10.	PROBLEMI E SOLUZIONI.....	9
11.	MARCHI REGISTRATI UTILIZZATI NEL PRESENTE DOCUMENTO	9
12.	SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI PRESENTI SULLE ETICHETTE	10

1. DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il kit Weak D-TYPE 1-2-3 Q è un dispositivo medico diagnostico in vitro per l'impiego da parte di personale qualificato. Il kit viene utilizzato come test confermativo a seguito di determinazioni incerte o discrepanti dell'antigene Rhesus D ottenute con metodi serologici e in caso di espressione debole a livello serologico dell'antigene D Rhesus (weak).

La composizione della mix di oligonucleotidi consente la tipizzazione specifica e qualitativa delle varianti alleliche RHD*01W.1, *01W.1.1, *01W.2 e *01W.3 in biologia molecolare come test di ulteriore determinazione.

2. PRINCIPIO DEL TEST

Il test utilizza come materiale di partenza il DNA genomico. Il DNA viene amplificato con primer di sequenza specifici (SSP). I primer sono specificamente ideati per l'amplificazione selettiva degli esoni 1, 6 e 9 del gene RHD, che consentono il riconoscimento solo delle varianti RHD*01W.1, *01W.1.1, *01W.2 e *01W.3. Gli ampliconi vengono rilevati mediante tecnica di real-time PCR (RT PCR) con l'idrolisi di sonde gene specifiche (sonde TaqMan®), che incrementa la sensibilità e la specificità diagnostica del test rispetto alla tecnologia convenzionale di SSP.

Se sono presenti gli ampliconi, le sonde vengono idrolizzate dalla Taq polimerasi, generando un segnale fluorescente che aumenta proporzionalmente con la quantità del prodotto di PCR. I segnali di fluorescenza vengono misurati dall'unità di rilevazione ottica del termociclatore real-time PCR. Il test si svolge in una singola reazione di PCR che rileva il controllo interno d'amplificazione (IAC: gene HBB umana) e le varianti associate con colori fluorescenti differenti.

3. MATERIALI

3.1 Contenuto del kit Weak D-TYPE 1-2-3 Q

- **230 µl Q Primermix WD123**, pronta all'uso, include primer e sonde
- **230 µl Q Mastermix**, pronta all'uso, include dNTPs, Taq Polimerasi, tampone di reazione
- Istruzioni per l'uso

3.2 Reagenti e dispositivi aggiuntivi

- Reagenti per l'estrazione di DNA (si veda lista dei kit validati al punto 5.2)
- Termociclatore per real-time PCR (si veda al punto 3.3 lista dei validati)
- Provette per reazione RT PCR e dispositivi di chiusura (si veda al punto 3.3 per quelli validati)
- Acqua distillata
- Pipette a pistone (range 0,5 – 1000 µl) e puntali

3.3 Raccomandazioni riguardo ai termociclatori e provette di reazione validati

Termociclatore	Provette di reazione RT PCR	Sistema di chiusura ottico
CFX96™ Real-Time PCR Detection System, fornitore: BioRad	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate, 96 white wells, black frame, Codice: 4ti-1201 Fornitore: 4titude/Brooks Life Sciences	4titude Crystal Strips, Codice: 4ti-0755 Optically clear adhesive film, Codice: 4ti-0560. Fornitore: 4titude//Brooks Life Sciences
MIC (Magnetic Induction Cycler) fornitore: Bio Molecular Systems	Provette e tappini: MIC-TUBES No. 68MIC-60653 Distributore esclusivo (D/A): Biozyme	
Rotor-Gene Q, fornitore: Qiagen	Strip di provette e tappini, 0.1 ml, Codice: 981103 o 981106, Fornitore: Qiagen	

Avvertenza: Se si impiegano altri termociclatori, provette o dispositivi ottici di chiusura, devono essere validati dall'utilizzatore.

4. CONSERVAZIONE E STABILITA'

I kit vengono spediti a temperatura ambiente. Una volta ricevuti, conservare tutti i reagenti a temperatura monitorata ≤ -20 °C. La data di scadenza è indicata sull'etichetta di ciascun componente del kit. La data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione esterna fa riferimento a quella del componente con stabilità minore contenuto nel kit. I test relativi a ripetuti cicli di scongelamento/congelamento non hanno evidenziato alcun effetto negativo sulla qualità del kit sino a 15 cicli. Le sonde marcate con fluoroforo sono estremamente sensibili alla luce. Conservare i reagenti al buio.

5. PROCEDIMENTO DEL TEST

5.1 Precauzioni di sicurezza ed avvertenze speciali

Le tecniche di genetica molecolare sono metodi particolarmente sensibili e dovrebbero essere condotte solo da personale adeguatamente istruito ed esperto. I risultati di questi test non devono essere utilizzati come unica fonte per prendere decisioni a livello clinico.

Occorre seguire particolari condizioni di sicurezza per evitare la contaminazione e quindi reazioni false positive:

- Indossare i guanti durante il lavoro (se possibile, senza talco).
- Cambiare il puntale ad ogni fase di dispensazione (con filtro).
- Se possibile, separare l'area di lavoro della pre-amplificazione (estrazione del DNA ed allestimento delle reazioni) da quella della post-amplificazione (rilevazione).
- Utilizzare dispositivi ed altri materiali solo in posti fissi e prescelti e non cambiarli.

5.2 Estrazione del DNA

Il campione da cui estrarre il DNA genomico dev'essere inviato in dispositivi di raccolta del sangue appropriati. Per il test è richiesto sangue in EDTA o citrato. La presenza di eparina è potenzialmente in grado di inibire la PCR, pertanto non sono adeguati dispositivi di raccolta del

sangue in eparina (3) e non dovrebbero essere impiegati. Si raccomanda di utilizzare un kit di estrazione di DNA marcato CE ed IVD.

Metodi validati di estrazione del DNA:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (colonnine)

Se il metodo standard impiegato nel laboratorio per l'estrazione di gDNA non corrisponde a quello sopra indicato o non è validato, deve essere validato dall'operatore.

Si richiede una concentrazione di DNA di 10-150 ng/μl per eseguire il test Weak D-TYPE 1-2-3Q.

Gli indici di purezza dovrebbero essere i seguenti:

- rapporto delle estinzioni $OD_{260}/OD_{280} > 1.5$ e < 2.0

Valori maggiori sono indicativi della presenza di RNA, valori inferiori segnalano invece la contaminazione con proteine.

- Rapporto delle estinzioni $OD_{260}/OD_{230} > 1.8$

Valori inferiori sono indicativi di una possibile contaminazione con carboidrati, sali o solventi organici.

5.3 Amplificazione

Utilizzare le provette di reazione consigliate dal produttore del termociclatore realtime o i dispositivi raccomandate nel paragrafo 3.3.

Per ogni campione da amplificare, aggiungere i seguenti reagenti ad ogni provetta PCR:

- 2 μl** Q Primermix
- 2 μl** Q Mastermix
- 1 μl** Campione di DNA (10-150 ng/μl)
- 5 μl** Acqua dist.

Il volume totale di ogni reazione di RT PCR è di 10 μl.

Nota: Qualora si impieghi il termociclatore Rotor-Gene Q, il volume di reazione per ogni RT PCR è di 20 μl. Pertanto, i volumi di reazione indicati devono essere duplicati per ogni provetta.

Nel caso in cui venga allestita una premix di Q Primermix, Q Mastermix ed acqua distillata per più campioni, si prega di considerare un adeguato eccesso per prevenire errori sui volumi pipettati.

Nel caso in cui si desideri inserire un **controllo negativo (NTC)**, preparare una reazione di PCR con acqua distillata in luogo del campione di DNA.

Chiudere le provette da PCR, effettuare una rapida centrifugata per raccogliere tutto il liquido sul fondo di ogni pozzetto; assicurarsi che non vi siano bolle nei pozzetti, in caso contrario picchiettare leggermente sul bancone per rimuoverle. Evitare il contatto diretto con la luce solare. Avviare con l'amplificazione secondo il seguente programma:

Fase del programma	Tempo	Temperatura	N° di cicli
Attivazione iniziale	10 Min	96°C	1 ciclo
Denaturazione	20 Sec	96°C	40 cicli
Annealing + Estensione	40 Sec + acquisizione	64°C	

- Qualora si impieghino i modelli di termociclatore Magnetic Induction Cycler (MIC) o CFX96™ Real-Time PCR Detection System mantenere le impostazioni di default.
- Qualora si impieghi il modello di termociclatore Rotor-Gene Q cycler, il volume di reazione di ogni RT PCR è 20 µl. Per l'analisi dati si può attivare la funzione "Use noise slop correction".

5.4 Interpretazione dei risultati

Tutti i test con gDNA umano devono mostrare segnale di fluorescenza nel canale 2 (giallo – VIC) corrispondente al controllo interno di amplificazione (IAC). I campioni positivi per RHD*01W.1 mostrano un segnale positivo nel canale 3. I campioni positivi per RHD*01W.2 mostrano un segnale positivo nel canale 1. I campioni positivi per RHD*01W.3 mostrano un segnale positivo nel canale 4. Un campione positivo per RHD*01W.1.1 mostra un segnale positivo nei canali 3 e 4 come raffigurato sotto.

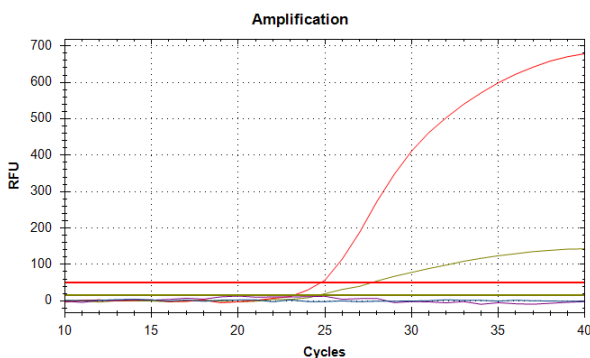


Figura 1: campione Weak D type 1 (RHD*01W.1) **rosso**- canale TexasRed

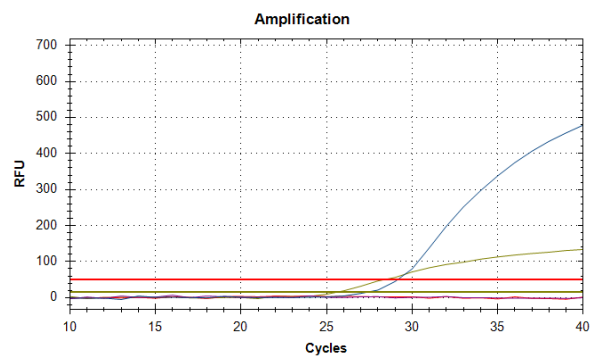


Figura 2: Campione Weak D type 2 (RHD*01W.2) **blu**- canale FAM

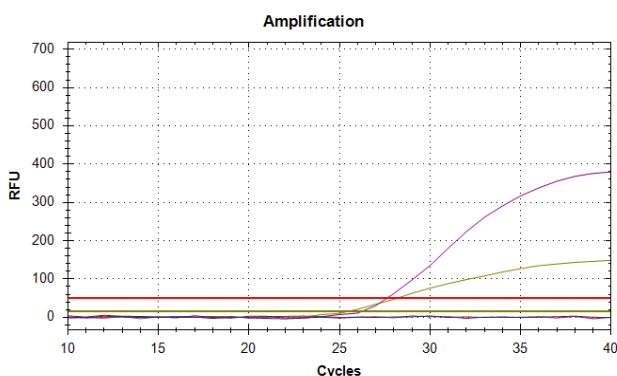


Figura 3: Campione Weak D type 3 (RHD*01W.3) **viola** – canale CY5

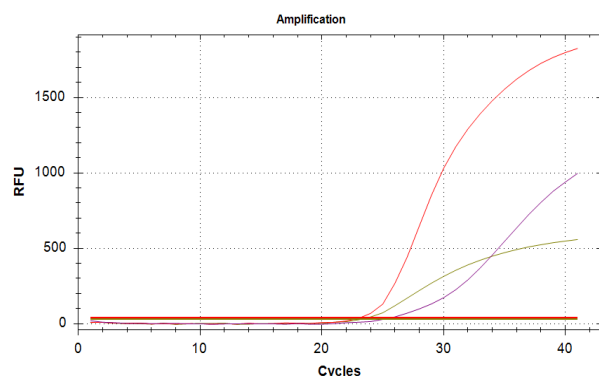


Figura 4: Campione Weak D type 1.1* (RHD*01W.1.1) **rosso** e **viola**

*Non è possibile escludere

RHD*01W.1 in combinazione con RHD*01W.3

Canale	Specificità [#]
Canale 3/Texas Red (weak D type 1 positivo)	RHD*01W.1 RHD*weak D type 1
Canale 1/FAM (weak D type 2 positivo)	RHD*01W.2 RHD*weak D type 2
Canale 4/Cy.5 (weak D type 3 positivo)	RHD*01W.3 RHD*weak D type 3
Canale 3+4/ Texas Red+Cy.5 (weak D type 1.1 positivo)	RHD*01W.1.1 RHD*weak D type 1.1

[#] Non si possono escludere i seguenti alleli : RHD*01W.1.2; RHD*01W.2.1, 2.2; RHD*01W.3.1, 3.2.

I segnali di amplificazione per campioni senza weak D type 1, 1.1, 2, o 3 dovrebbero essere al di fuori dei valori di Cq definiti per i canali 1,3 e 4. Il controllo negativo (No Template Control = NTC) con acqua distillata non dovrebbe mostrare alcun segnale fluorescente nel corso di tutto il test di RT PCR e costituisce un controllo di contaminazione. Segnali fluorescenti per il controllo negativo con acqua distillata all'interno dei valori di Cq definiti indicano contaminazione. Segnali fluorescenti al di fuori dei valori di Cq definiti possono verificarsi data la estrema sensibilità della metodica in caso di pipettamento inaccurato. Qualora accadesse, il test dovrebbe essere ripetuto.

I seguenti segnali vengono interpretati come positivi:

	Canale/ fluoroforo	Threshold predefiniti	Livello di Cq	LOD-Cq	Lunghezze d'onda in nm
RHD*01W.1, positivo	Canale 3/ Texas Red	100	21	29	Eccitazione: 597 Emissione: 616
RHD*01W.1.1, positivo	Canale 4/ Cy. 5	100	25	34	Eccitazione: 651 Emissione: 674
	Canale 3/ Texas Red	100	21	29	Eccitazione: 597 Emissione: 616
RHD*01W.2, positivo	Canale 1/ FAM	100	25	31	Eccitazione: 495 Emissione: 520
RHD*01W.3, positivo	Canale 4/ Cy. 5	100	25	34	Eccitazione: 651 Emissione: 674
Controllo interno d'amplificazione	Canale 2/ VIC	50	19	29	Eccitazione: 538 Emissione: 554

Nota speciale: I threshold predefiniti dovrebbero essere scelti solo per la combinazione del termociclatore CFX96 con le provette di reazione PCR. I canali 1 - 4 sono riferiti al termociclatore CFX96 e potrebbero variare in altri dispositivi. Con il modello Magnetic Induction Cycler si deve impostare l'autoset del threshold.

Per livello di Cq si intende il ciclo di PCR che mostra un segnale positivo rispetto al background.

LOD-Cq è l'ultimo ciclo di PCR che può essere interpretato come segnale positivo rispetto al background.

6. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Weak D-TYPE 1-2-3 Q è stato ideato per uso diagnostico in vitro e dovrebbe essere utilizzato solo da personale adeguatamente istruito e qualificato. Le procedure devono essere eseguite utilizzando la buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practices).

Il materiale biologico utilizzato per l'estrazione del DNA, ad es. sangue umano, dovrebbe essere maneggiato come se fosse potenzialmente infettivo. Nel maneggiare materiale biologico si raccomanda di adottare precauzioni di sicurezza adeguate (non pipettare con la bocca, indossare guanti monouso mentre si utilizza materiale biologico e durante il test, disinfettare le mani una volta terminato il test).

Prima dello smaltimento, il materiale biologico deve essere inattivato (ad es. in un ciclo di autoclave). I materiali consumabili dovrebbero essere autoclavati o bruciati dopo l'uso.

Fuoriuscite accidentali di materiale potenzialmente infettivo devono essere immediatamente rimosse con un tessuto di carta assorbente e le aree contaminate devono essere trattate con un disinfettante o con alcool al 70%. Il materiale utilizzato per pulire le fuoriuscite, guanti compresi, dev'essere inattivato prima dello smaltimento (ad esempio in un ciclo di autoclave).

Smaltire i campioni, i reagenti non utilizzati e gli scarti secondo le legislazioni comunitarie, nazionali e locali.

Durante la preparazione di aliquote dalle bottiglie dei reagenti, porre molta attenzione per evitare contaminazione microbica. Si raccomanda l'uso di pipette consumabili e puntali sterili. Non utilizzare reagenti che presentano una soluzione torbida o evidente contaminazione microbica.

Una dichiarazione relativa alle schede di sicurezza (**MSDS**) può essere scaricata dal sito www.bag-diagnostics.com.

7. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

La combinazione dei primer e delle sonde assicura una identificazione affidabile degli alleli Rhesus D specificati nel paragrafo 5.4. L'accuratezza e riproducibilità del kit è verificata per ogni lotto con campioni di riferimento pre-tipizzati.

Per il kit Weak D-TYPE 1-2-3 Q è stato condotto un lavoro di valutazione dell'efficacia con 526 campioni di DNA pre-tipizzati. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con altre metodiche certificate CE (tra le quali serologia, SSP, SSO) e/o sequenziamento. Si è rilevata una concordanza del 99,8%.

	Test totali senza NTC	WD1	WD1.1	WD2	WD3	IAC	Concordanza col riferimento [%]
<i>Studio interno</i>	335	18	2	6	5	335	100
<i>Studio esterno</i>	191	60	11	39	14	190	99,5
Totale	526	78	13	45	19	525	99,8

Tabella: Sommario dei risultati degli studi interni/esterni con concordanza percentuale rispetto alla tipizzazione di riferimento e rilevazione di Weak D type 1, 1.1, 2 e 3.

8. LIMITI DEL METODO

Data l'elevata suscettibilità della metodica di RT-PCR alla cross contaminazione, si raccomanda particolare cura durante l'estrazione di DNA. I test di validazione nel corso dello studio della valutazione dell'efficacia del kit Weak D-TYPE 1-2-3 Q hanno mostrato come una variazione tra 10 ng e 150 ng della quantità di DNA impiegato per l'amplificazione non influenza significativamente la rilevazione degli alleli weak D type 1, 1.1, 2 o 3.

Prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti del kit ed altri materiali e dispositivi di laboratorio con amplificati o DNA genomico. Si raccomanda vivamente di eseguire test di contaminazione (wipe test – ad es. con Wipetest della BAG, REF 7091) e di includere i controlli negativi con acqua distillata in ogni test.

Nel controllo negativo con acqua distillata non deve mostrarsi alcun segnale fluorescente ($Cq > N.A.$). Nel caso in cui si rilevi segnale nel controllo negativo (canale 2) lo spazio di lavoro per allestimento della PCR dev'essere opportunamente decontaminato ed i reagenti eventualmente rinnovati se necessario.

Tutti gli strumenti e dispositivi (ad es. pipette, termociclatori realtime) devono essere calibrati secondo le istruzioni del produttore.

9. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Il controllo di qualità interno dei nuovi lotti del kit Weak D-TYPE 1-2-3 Q può essere eseguito utilizzando una combinazione di campioni di DNA con genotipo RH D weak noto. Nella Q Primermix è incluso un controllo di amplificazione interno per verificare la corretta amplificazione. Si raccomanda l'uso dei controlli negativi per controllare le possibili contaminazioni. Come controllo negativo, allestire una reazione di PCR senza DNA.






10. PROBLEMI E SOLUZIONI

Sintomo	Possibili cause	Soluzioni potenziali
Segnale cattivo o assente	Presenza di un inibitore.	Utilizzare reagenti freschi.
	Assenza di gDNA nella reazione.	Ripetere il test. Verificare i corretti volumi di pipettaggio.
	Parametri errati di amplificazione.	Verificare il programma di PCR e la velocità di ramping.
	DNA contaminato o degradato.	Verificare la concentrazione di DNA e sua qualità. Controllare il DNA su gel. Ripetere l'estrazione di DNA.
	Sonde fluorescenti o primer degradati.	Impiegare una Q primermix nuova. Evitare l'esposizione alla luce e cicli frequenti di congelamento/scongelamento. Osservare le condizioni di conservazione!
	Bolle nella reazione di PCR / liquido residuo sulle pareti interne della provetta.	Pipettare attentamente. Spinnare la piastra PCR.
	Plastiche non compatibili o di scarsa qualità per RT-PCR.	Utilizzare plastiche compatibili e di alta qualità (si veda il par. 3.3)
	Errato calcolo del segnale causato da segnali anomali di amplificazione durante i cicli iniziali del test.	Applicare misure correttive nel software (es. la funzione "apply fluorescence drift correction" in dispositivo BioRad o esclusione dei primi cinque cicli dall'analisi).
Evaporazione dei reagenti per insufficiente chiusura delle provette PCR.	Verificare che le provette PCR siano chiuse propriamente. Fare attenzione ai bordi dei fogli sigillanti.	
Segnale nel controllo negativo	Contaminazione con DNA nel controllo negativo.	Ripetere il controllo negativo. Decontaminare la postazione di lavoro.

11. MARCHI REGISTRATI UTILIZZATI NEL PRESENTE DOCUMENTO

TaqMan® è un marchio registrato di Roche Molecular Systems Inc.

12. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI PRESENTI SULLE ETICHETTE

	Sufficiente per n test
	Temperatura di conservazione / Limiti di temperatura
	Utilizzare entro
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Fabbricante
BLOOD TYPING	Destinazione d'uso: tipizzazione ematica
IFU	Istruzioni d'uso
IVD	Per uso diagnostico in vitro
LOT	Numero lotto
Q Primermix WD123	Mix oligonucleotidi per tipizzazione di weak D1, 1.1, 2 e 3
Q Mastermix	Mastermix per Weak D-TYPE 1-2-3 Q
REF	Numero di catalogo

13. BIBLIOGRAFIA

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

Ulteriori informazioni ed Istruzioni d'uso in altre lingue sul sito:

<http://www.bag-diagnostics.com> o inviare una mail a info@bag-diagnostic.com
o tel. +49 (0)6404-925-125