

IT

## Istruzioni per l'uso

## 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

## Indice

1. USO PREVISTO .....	2
2. DESCRIZIONE DEL PRODOTTO .....	2
3. PRINCIPIO DEL TEST .....	2
4. MATERIALE .....	3
4.1 Contenuto dei kit .....	3
4.2 Reagenti e dispositivi aggiuntivi richiesti .....	3
4.3 Termociclatori e provette di reazione validati .....	3
5. CONSERVAZIONE E STABILITÀ .....	3
6. PROCEDURA DEL TEST .....	3
6.1 Precauzioni e avvertenze speciali .....	3
6.2 Estrazione del DNA .....	4
6.3 Inserimento delle informazioni del campione nel software PlexTyper .....	4
6.4 Allestimento della PCR .....	4
6.5 Configurazione dei termociclatori RT-PCR .....	5
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 System Inc .....	6
6.5.3 Sistema QuantStudio™ 6 Flex, Applied Biosystems .....	7
6.6 Esportazione dei risultati .....	8
6.6.1 CFX96 Touch™ Real.time PCR Detection System, Bio-Rad .....	8
6.6.2 LightCycler® 480 II Real.time PCR Detection System, Roche Molecular System Inc .....	9
6.6.3 Sistema QuantStudio™ 6 Flex, Applied Biosystems .....	9
6.7 Valutazione e interpretazione dei risultati .....	10
7. AVVERTENZE E ISTRUZIONI DI SMALTIMENTO .....	10
8. SPECIFICITÀ DEI KIT .....	11
9. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI .....	13
10. LIMITAZIONI DEL METODO .....	15
11. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO .....	15
12. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI .....	15
13. MARCHI COMMERCIALI UTILIZZATI .....	16
14. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI SULLE ETICHETTE .....	17
15. BIBLIOGRAFIA .....	17

Versione: 04/2021 / Edizione: 2021-04

## 1. USO PREVISTO

I kit ERY Q® sono dispositivi medico-diagnostici in vitro destinati all'uso da parte di professionisti in laboratori specializzati.

I kit ERY Q® RH, -Partial D, -Weak D, -ABO, -ABO variant e -KKD / MNS kit sono destinati alla determinazione di secondo livello delle caratteristiche dei gruppi sanguigni utilizzando campioni di DNA genomico ottenuti da donatori, riceventi e donne in gravidanza. La determinazione di secondo livello in genetica molecolare viene effettuata utilizzando la tecnica SSP PCR e la rilevazione in tempo reale (Realtime PCR) degli ampliconi.

I kit ERY Q® RH, -Partial D, -Weak D, - ABO variant e -ABO devono essere utilizzati esclusivamente per la determinazione di secondo livello delle rispettive caratteristiche. Sono utilizzati per completare e confermare precedenti risultati sierologici in caso di risultati di tipizzazione discrepanti o dubbi. Lo stesso vale per la determinazione delle caratteristiche Kell (K), Kidd (K) e Duffy (D). Il test per la determinazione delle caratteristiche KKD deve essere impiegato solo per la determinazione di secondo livello.

I kit ERY Q® HPA, -HNA e -Rare sono destinati alla tipizzazione delle caratteristiche del gruppo sanguigno, delle piastrine e dei granulociti utilizzando campioni di DNA genomico ottenuti da donatori, riceventi e donne in gravidanza. La genotipizzazione molecolare viene effettuata utilizzando la tecnica SSP PCR e la rilevazione in tempo reale (Realtime PCR) degli ampliconi.

Per la determinazione delle caratteristiche MNS utilizzando il kit ERY Q® KKD / MNS e per la genotipizzazione delle caratteristiche di HNA, HPA e gruppi sanguigni rari utilizzando i kit ERY Q® HPA, -HNA e -Rare, non è obbligatoria una pre-tipizzazione sierologica iniziale.

## 2. DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

I kit ERY Q® vengono impiegati per la determinazione genetica molecolare di secondo livello o determinazione degli alleli dei gruppi sanguigni, HNA ed HPA. Tutti gli alleli clinicamente rilevanti vengono coperti, si veda il cap. 8 – specificità dei kit. I kit di tipizzazione ERY Q® contengono tutti i componenti richiesti per la reazione di PCR. La valutazione dei risultati viene effettuata con software PlexTyper®.

## 3. PRINCIPIO DEL TEST

Il test viene eseguito con DNA genomico come materiale di partenza. Il DNA viene amplificato tramite PCR con primer sequenza-specifici (SSP). I primer sono stati sviluppati appositamente per l'amplificazione selettiva di parti specifiche di alleli o gruppi allelici. Gli ampliconi vengono rilevati anche con sonde di idrolisi marcate con colorante fluorescente specifiche per il locus genico (sonde TaqMan®), che aumentano la specificità del test rispetto a un SSP-PCR convenzionale.

Se sono presenti ampliconi, le sonde vengono idrolizzate dalla Taq polimerasi e viene generato un segnale di fluorescenza che aumenta proporzionalmente alla quantità del prodotto della PCR. I segnali di fluorescenza vengono misurati dall'unità di rilevamento ottico del termociclature RT-PCR. Nella PCR multiplex è incluso un controllo interno di amplificazione (ormone della crescita umano, HGH) che viene rilevato grazie a un canale in un colore differente rispetto alle reazioni specifiche.

## 4. MATERIALE

### 4.1 Contenuto dei kit

- **Plex Mix**, pronto all'uso, contiene dNTP, Taq Polimerasi, tampone di reazione
- **ERY Q® 8-well PCR strips** con miscele di reazione predispensate e liofilizzate contenenti primers e sonde specifiche e primer di controllo e sonde per l'HGH (miscele di oligo)
- **Tappini PCR (da 8)**

La Plex Mix è disponibile anche separatamente come accessorio IVD (REF 728298). La Plex Mix dev'essere impiegata solo con i prodotti BAG specificati nelle Istruzioni d'Uso della Plex Mix.

### 4.2 Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari

- Reagenti per l'estrazione del DNA (per i kit d'estrazione del DNA validati vedere il cap. 6.2)
- Real-Time PCR-Cycler (per i termociclatori validati vedere il cap. 4.3)
- Acqua distillata
- Pipette a volume variabile (0,5 - 1000 µl) e relativi puntali
- Centrifuga per piastre

#### Adattatori piastre/strip:

- per LightCycler® 480 II: Vari-Plate™ 96 Well Semi-Skirted Frame, Roche Style (Brooks Life Science (4titude), cod. 4ti-0950W-F) or LightCycler® 8-Tube-Strip Adapter Plate (Roche, cod. 06612598001)
- per QuantStudio™ 6 Flex System: Fast 96 Well Plate Adapter (accessorio standard, cod. 4459846 come parte di ricambio, ThermoFischer (Applied Biosystem))

### 4.3 Termociclatori RT-PCR validati

I seguenti termociclatori RT sono validati per l'impiego coi kit ERY Q®:

- 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. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I kit vengono spediti in ghiaccio. Al ricevimento, conservare tutti i reagenti in dispositivi a temperatura controllata a  $\leq -20$  °C. La data di scadenza è indicata sull'etichetta di ogni reagente. La data di scadenza indicata sull'etichetta esterna si riferisce al reagente con la stabilità più breve contenuto nel kit. Il test con cicli di congelamento-scongelo ha dimostrato che fino a 12 cicli per Plex Mix non hanno effetti negativi sulla qualità del kit. Se richiesto, si consiglia di aliquotare i reagenti se necessario.

## 6. PROCEDURA DEL TEST

### 6.1 Precauzioni ed avvertenze speciali

Le tecniche di genetica molecolare sono particolarmente sensibili e dovrebbero essere eseguite da personale ben addestrato ed esperto in queste tecniche.

Per evitare contaminazioni e quindi false reazioni devono essere osservate particolari condizioni di sicurezza:

- Indossare guanti durante il lavoro (senza polvere, se possibile).
- Utilizzare nuovi puntali ad ogni fase di pipettaggio (con filtro integrato).
- Se possibile, utilizzare aree di lavoro separate per pre-PCR (estrazione del DNA e allestimento della PCR) e post-PCR (rilevamento e PCR).
- Utilizzare dispositivi e altri materiali solo nei rispettivi luoghi e non scambiarli.

## 6.2 Estrazione del DNA

Il materiale campione per l'estrazione del DNA genomico deve essere inviato in appropriati sistemi di raccolta del sangue. Per il test è necessario sangue in EDTA o citrato. La presenza di eparina potenzialmente inibisce la PCR (1); tali dispositivi non sono adatti e non devono essere impiegati.

### Kit di estrazione di DNA validati:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (colonnine)

Sono validati sia il metodo di estrazione manuale che quello automatico (QIAcube).

Se per l'estrazione del gDNA il metodo standard in uso nel laboratorio non corrisponde al kit validato sopra indicato, deve essere validato dall'utente.

Il DNA deve avere i seguenti indici di purezza:

- $OD_{260}/OD_{280} = > 1.5 \text{ e } < 2.0$   
Valori più alti sono un indicatore di contaminazione con RNA, valori più bassi indicano contaminazione con proteine.
- $OD_{260}/OD_{230} = > 1.8$   
Valori inferiori indicano una contaminazione con sali, carboidrati o solventi organici.

## 6.3 Inserimento delle informazioni del campione nel software Plextyper

E' obbligatorio impiegare il software PlexTyper® per analizzare i dati di ERY Q®. E' consigliato inserire le informazioni del campione in PlexTyper® ed impostare il test prima di allestire l'amplificazione di PCR per ottenere un RUN ID unico. Per informazioni dettagliate sul software PlexTyper® si prega di consultare le istruzioni d'uso dello stesso sul sito web <http://www.bag-diagnostics.com>

## 6.4 Allestimento della PCR

### **Avvertenze:**

- Il volume di reazione di ogni PCR è di 10 µl (per ciascun pozzetto).
- Per il test è richiesta una concentrazione di DNA compresa tra 10- 30 ng/µl.

### **Procedura di pipettamento:**

La parte superiore delle strip è marchiata con una stampa del batch, la Mix 1 è nel pozzetto appena al di sotto dello stampato. Prestare attenzione all'orientamento della strip, soprattutto in fase di caricamento del termociclatore.

Per un pozzetto, pipettare 2 µl Plex Mix, 1 µl campione DNA e 7 µl Acqua dist. nella provetta di reazione.

Per ogni campione (strip da 8 pozzetti) allestire una pre-mix (si raccomandano volumi per 9 pozzetti).

**18 µl** Plex Mix  
**9 µl** DNA campione  
**63 µl** Acqua. dist.

**Avvertenza:** Per ogni campione del kit ERY Q® ABO variant (2 x 8 pozzetti, le due strip sono marchiate con 1 e 2 sotto la stampa del batch) allestire una pre-mix (si raccomandano volumi per 18 pozzetti):

**36 µl** Plex Mix  
**18 µl** DNA campione  
**126 µl** Acqua. dist.

Di questa miscela, 10 µl vanno dispensati in ciascuno degli 8 pozzetti (o 16 pozzetti).

Per un controllo negativo (NTC), si allestisca un test con acqua dist. in luogo del campione DNA.

**Avvertenza:** Quando si pipetta nei pozzetti per PCR è importante che la punta della pipetta non tocchi la miscela essiccata (colorata in blu) sul fondo del pozzetto. Si consiglia di pipettare a lato del pozzetto, si veda la figura 1.

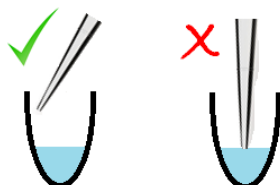


figura 1: Descrizione schematica della procedura di pipettaggio

Chiudere le provette di reazione e centrifugare brevemente il liquido. Assicurarsi che le strisce siano completamente chiuse dai tappi. Assicurarsi che non ci siano bolle nelle provette di reazione. Se compaiono bolle, picchiettare delicatamente le provette sul banco da laboratorio per rimuoverle. Quindi procedere alla reazione PCR.

**Avvertenza:** I termociclatori diversi da quelli elencati al punto 4.3 non sono validati e possono richiedere parametri di PCR diversi. Il software PlexTyper® è essenziale per l'interpretazione dei risultati e il software importerà solo i dati da strumenti validati.

## 6.5 Configurazione dei termociclatori RT-PCR

Vengono utilizzati i seguenti fluorofori per la linea di prodotto ERY Q®.

Fluoroforo	Lunghezza d'onda in nm	
FAM	Eccitazione: 495	Emissione: 520
CAL Fluor® Orange 560	Eccitazione: 538	Emissione: 559
CAL Fluor® Red 610	Eccitazione: 590	Emissione: 610
Quasar® 670	Eccitazione: 647	Emissione: 670

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

**Nota:** non modificare i nomi dei coloranti nel software CFX. Il software PlexTyper® necessita dei nomi dei coloranti predefiniti per la valutazione e per una corretta importazione.

**Tabella: Programma PCR**

Fase	Tempo [s]	Temperatura [° C]	Velocità di rampa [°C/s]	Letture	Cicli
Attivazione iniziale	120	96	2,5	-	1
Denaturazione	5	98	2,5	-	13
Annealing+ estensione	25	68	2,5	-	
Denaturazione	5	98	2,5	-	37
Annealing+ estensione	25	68	-	sì	

**Nota:** Con il sistema di rilevamento PCR realtime CFX96 Touch™, è necessario utilizzare una velocità di riscaldamento modificata del dispositivo (velocità di rampa). Questi sono elencati nella tabella del programma PCR mostrata sopra (colonna "Velocità di rampa"). Prima di avviare la seduta è necessario selezionare "**All channels**" e la temperatura del coperchio deve essere impostata a 105 °C.

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

Si prega di notare che la sorgente di luce per questo termociclatore è stata modificata. Dal numero di serie 29001 è una lampada a LED, prima c'era una lampada allo xeno. Il test è stato validato su uno strumento con lampada LED. Si prevede che anche le versioni precedenti siano compatibili con il test, ma è probabile che sia necessaria una compensazione del colore. Si prega di contattare BAG Diagnostics se si dispone di uno strumento con una lampada allo xeno e i risultati non sono ottimali.

**Nota:** Per le strip in ERY Q® è richiesto un supporto speciale per il Lightcycler® 480 II: il frame semi-bordato Vari-Plate™ Telaio a 96 pozzetti, la piastra adattatrice Roche Style o l'adattatore LightCycler® per strisce di 8 provette (vedere capitolo 4.2). Per ulteriori informazioni, contattare BAG Diagnostics.

### Programma PCR

Come descritto nella guida per l'utente del produttore per LightCycler® 480 II, impostare e salvare un protocollo PCR con i seguenti parametri:



**Formato di rilevamento:** ERY Q®, dimensione blocco 96, volume di reazione 10 µl

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

### Canali per LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System

Utilizzare la seguente impostazione del canale.

		Emissione					
		488	510	580	610	640	660
Eccitazione	440						
	465		✓				
	498						
	533			✓	✓		
	618						✓

Filtro di eccitazione	Filtro emissione	Nome	Melt factor	Quant factor	Max Integration Time (sec)
465	510	FAM	1	10	1
		O560			
533	580	(CalFluor Orange560)	1	10	1
		R610			
533	610	(CalFluor Red610)	1	10	1
		Q670			
618	660	(Quasar670)	1	10	1

Non è necessario utilizzare la funzione di compensazione del colore nel programma LightCycler poiché il software PlexTyper® esegue questi calcoli durante l'analisi.

**Impostazioni dello strumento per il tipo di piastre:** White plates

### 6.5.3 Sistema QuantStudio™ 6 Flex, Applied Biosystems

**Nota:** Per le strisce ERY Q® è necessario un supporto speciale per il sistema QuantStudio™ 6 Flex: Fast 96 Well Plate Adapter (si veda il capitolo 4.2). Per ulteriori informazioni, contattare BAG Diagnostics.

**Proprietà esperimento:**

Instrument type (Tipo di strumento): QuantStudio™ 6 Flex System
Block type (Tipo di blocco): Fast 96-Well (0,1 ml)
Experiment type (Tipo di esperimento): Comparative Ct ( $\Delta\Delta Ct$ )
Reagent type (Tipo di reagent): TaqMan® Reagents
Run properties (Proprietà della corsa): standard

**Nota:** è necessario eseguire la calibrazione del colorante custom (custom dye calibration)!

**Definizione dei target:**

Target Name	Reporter	Quencher	Colore
FAM	FAM	NFQ-MGB	Green
O560	O560	NFQ-MGB	Blue
R610	R610	NFQ-MGB	Red
Q670	Q670	NFQ-MGB	Purple

**Passive reference:** None

**Assign:** Assign all targets to each well.

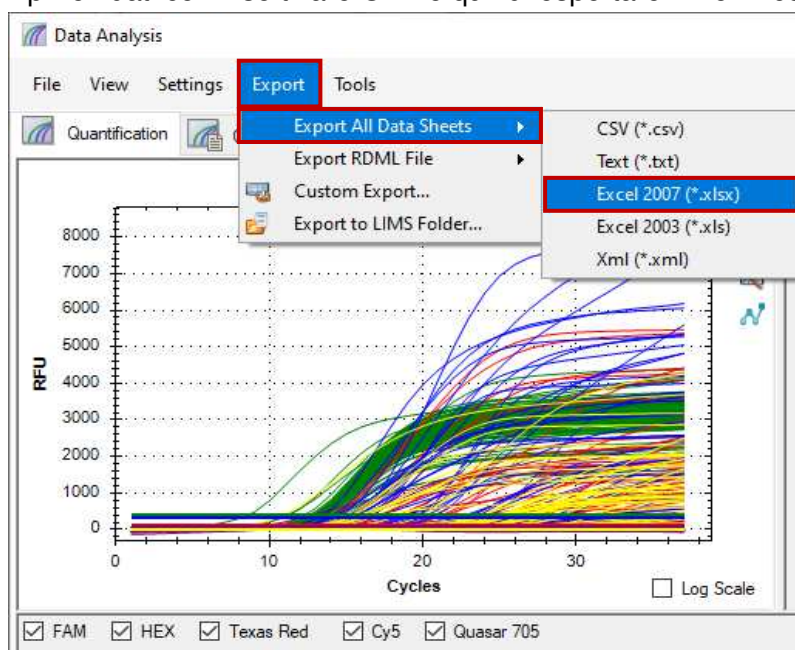
**Run Method:**

Reaction volume: 10  $\mu$ l

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 Esportazione dei risultati****6.6.1 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad**

Aprire i dati con il software CFX e quindi esportare il file Excel 2007 (.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

**Nota:**

È necessario solo il file "Quantification Amplification Results". È utile eliminare gli altri file.

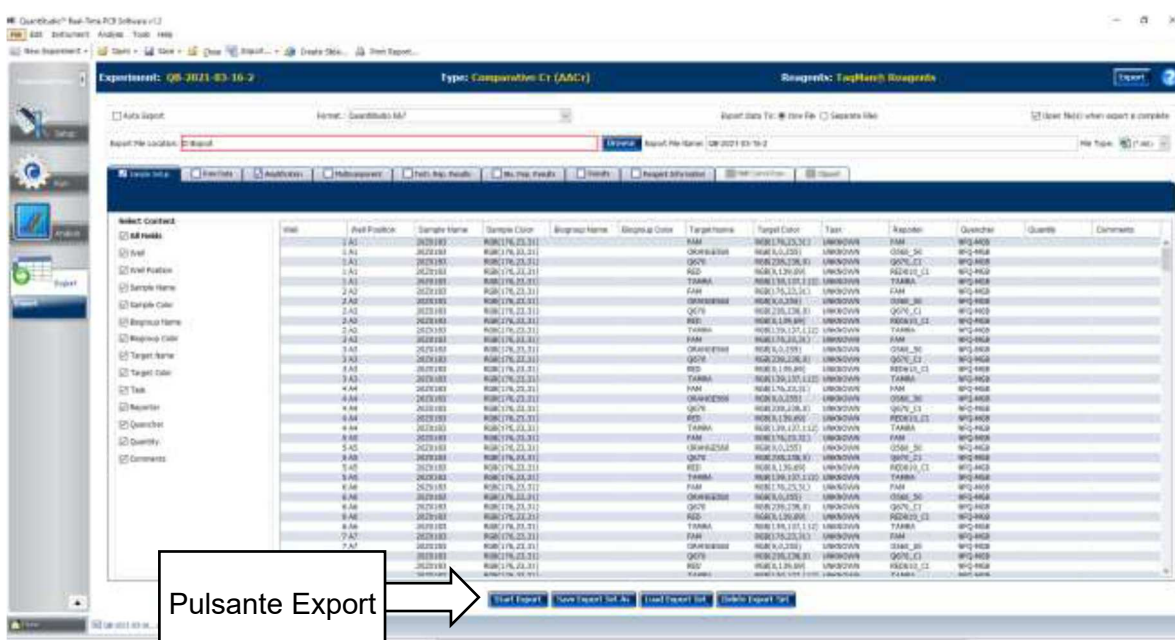
### 6.6.2 LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System, Roche Molecular Systems Inc.

PlexTyper® utilizza file xml da LightCycler® 480 II. Una volta completata la corsa, non è necessario eseguire l'analisi nel software Roche. Esportare i dati grezzi in formato XML.



### 6.6.3 Sistema QuantStudio™ 6 Flex, Applied Biosystems

Aprire il menu Export e avviare l'esportazione della scheda "Sample Setup" e "Amplification" come file (\*.xls).



## 6.7 Valutazione ed interpretazione dei risultati

Per la valutazione e l'interpretazione dei dati è necessario utilizzare il PlexTyper® software (disponibile gratuitamente presso BAG Diagnostics) in combinazione con i file di dati kit specifici per PlexTyper®. I file del kit necessari per la valutazione sono disponibili dal server di download di BAG Diagnostics. ([www.service.bag-diagnostics.com](http://www.service.bag-diagnostics.com))

Annotare il prodotto e il numero di lotto del kit utilizzato. I file del kit sono specifici del prodotto e del lotto e anche specifici per il termociclatore RT-PCR utilizzato. L'uso di file kit errati (kit sbagliato, lotto sbagliato, termociclatore errato) potrebbe causare una genotipizzazione errata.

Per l'interpretazione dei risultati da un termociclatore, i dati devono essere trasferiti (ad es. con una chiavetta USB adatta) a un computer che su cui sia installato il software di BAG Diagnostics PlexTyper®. Si prega di fare riferimento alle istruzioni d'uso di PlexTyper® per l'interpretazione dei dati.

È possibile, ma non essenziale, eseguire un'ampia revisione dei dati sul software del termociclatore. Ad esempio, un'amplificazione valida deve mostrare segnali di fluorescenza adeguati per il controllo dell'amplificazione interna nel canale FAM. Le reazioni positive mostrano un segnale di colore positivo nel canale corrispondente.

Come controllo della contaminazione viene utilizzato un controllo negativo (NTC). Se del DNA o un amplicone contaminante vengono aggiunti inavvertitamente alla reazione NTC, si risconterà un segnale positivo. Se il Cq è inferiore a 36 verrà rilevato come possibile contaminazione da PlexTyper® software e verrà generato un messaggio di avviso. I segnali di amplificazione superiori a Cq 36 nell'NTC sono considerati artefatti della PCR e vengono ignorati. Se si sospetta una contaminazione da PCR, è consigliabile seguire le linee guida locali in uso nel laboratorio per la decontaminazione e sostituire i reagenti.

I dati grezzi raccolti dal software specifico del termociclatore verranno importati in PlexTyper® Software. Sulla base dei valori Cq, RFU (Relative Fluorescence Units) e la forma della curva di amplificazione il software PlexTyper® valuta le reazioni positive e negative da cui vengono inferiti il tipo di gruppo sanguigno genetico molecolare o le specificità HNA / HPA del campione.

## 7. AVVERTENZE E ISTRUZIONI DI SMALTIMENTO

Questi kit dovrebbero essere utilizzati solo da personale adeguatamente formato e qualificato. Tutto il lavoro deve essere eseguito utilizzando le buone pratiche di laboratorio (GLP).

Il materiale biologico utilizzato per l'estrazione del DNA, ad esempio il sangue, deve essere trattato come potenzialmente infettivo. Quando si maneggia materiale biologico si raccomandano adeguate precauzioni di sicurezza (non pipettare con la bocca; indossare guanti monouso durante la manipolazione di materiale biologico e l'esecuzione del test; disinfettare le mani al termine del test).

Il materiale biologico deve essere inattivato prima dello smaltimento (ad esempio in un'autoclave). I prodotti monouso devono essere sterilizzati in autoclave o inceneriti dopo l'uso.

La fuoriuscita di materiali potenzialmente infettivi deve essere rimossa immediatamente con carta assorbente e le aree contaminate devono essere tamponate con un disinfettante standard adatto o



Prodotto	Specificità	
ERY Q® D weak 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® D Partial 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
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*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

Prodotto	Specificità	
	ABO*AW.30.01 ABO*cisAB.01	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	GYP A*01 GYP A*02 GYP B*03 GYP B*04 GYP B*03N.01 # GYP B*03N.04 # FY*02W.01 FY*02N.01
ERY Q® Raro 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

# Non è stato possibile testare queste specificità positive a causa della loro rarità.

## 9. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Per i kit ERY Q® HPA, HNA, RH, Weak D, Partial D, ABO, ABO variant, KKD / MNS e Rare, gli studi sulle prestazioni sono stati condotti con campioni di DNA pretipizzati. I risultati della tipizzazione sono stati confrontati con i risultati ottenuti con reagenti di tipizzazione certificati CE (ad es. SSP, sierologia) e sequenziamento degli acidi nucleici.

Se non erano disponibili campioni di DNA per alleli rari, questi sono stati sostituiti da campioni di DNA prodotti sinteticamente e la reattività delle miscele è stata testata.

Per i prodotti sono stati effettuati studi di valutazione delle prestazioni esterne ed interne in vari centri di donazione di sangue, laboratori medici e presso BAG da personale qualificato. La tipizzazione con i kit ERY Q® ha prodotto la seguente conformità ai risultati della pre-tipizzazione:

Kit	Numero di campioni testati con il TC Bio Rad CFX	Concordanza con la tipizzazione di riferimento
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%

Kit	Numero di campioni testati con il TC Bio Rad CFX	Concordanza con la tipizzazione di riferimento
ERY Q® ABO Variant	116	100%
ERY Q® KKD / MNS	82	* 96,3%
ERY Q® Rare	87	* 97,7%

\* **Nessun risultato di sequenziamento chiaro dei campioni di riferimento.**

Kit	Numero di campioni testati con LightCycler® 480 II	Numero di campioni testati con QuantStudio™ 6 Sistema Flex	Concordanza con la tipizzazione di riferimento
ERY Q® HPA	10	12	100%
ERY Q® HNA	8	12	100%
ERY Q® RH	15	12	100%
ERY Q® Debole D	15	10	100%
ERY Q® Parziale D	11	6	100%
Variante ERY Q® ABO / ERY Q® ABO	14	12	100%
ERY Q® KKD / MNS	3	10	100%
ERY Q® Raro	11	12	100%

Non tutte le specificità potrebbero essere testate a causa di campioni rari o assenti. La specificità può essere derivata dalla validazione con CFX.

### 9.1 Sostanze cross-reattive

Sono state testate otto sostanze che potrebbero interferire con il test e le seguenti concentrazioni non hanno avuto alcun effetto dannoso sui risultati:

Sostanza	Massima concentrazione non inibitoria
Proteine (BSA)	0,2 mg/ml
TE (Tris / EDTA, pH 8.0)	7 mM Tris, 0,7 mM EDTA
NaCl	20 mM
Etanolo	1%
Emoglobina	0,01 mg/ml
Citrato di sodio	7 mM
Tampone di estrazione del DNA 1 (Kit Qiagen QIAamp DNA Blood)	1%
Tampone di estrazione del DNA 2 (Kit Qiagen QIAamp DNA Blood)	2%



## 10 LIMITAZIONI DEL METODO

Se non si ottengono risultati chiari con i kit ERY Q® (ad esempio a causa di alleli sconosciuti che non vengono rilevati con i primer e le sonde esistenti), dovrebbero essere seguite le linee guida trasfusionali nazionali in accordo con le tipizzazioni sierologiche. Si consiglia di sequenziare i campioni con risultati poco chiari per determinare il genotipo. I risultati del test dovrebbero essere valutati tenendo conto della variabilità genetica nei diversi gruppi etnici. In caso di dubbio è valido il fenotipo.

Poiché il metodo RT-PCR è molto sensibile alla contaminazione crociata con il DNA, è necessario tenerne conto durante il processo di estrazione. È necessario prestare particolare attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti del kit e di altri materiali di laboratorio con ampliconi o DNA.

Per evitare false reazioni positive e negative dovute alla contaminazione, si consiglia vivamente di effettuare un controllo negativo con acqua distillata. Nessun segnale di fluorescenza con un Cq <36 deve essere rilevato nel controllo negativo con acqua distillata. In caso di comparsa del segnale nel controllo negativo, potrebbe essere necessario decontaminare il posto di lavoro del laboratorio PCR dal DNA e, se necessario, sostituire i reagenti.

Tutti i dispositivi (es. Pipette, realtime cycler) devono essere calibrati secondo le istruzioni del produttore.

## 11. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

I controlli di qualità interni per i nuovi lotti possono essere eseguiti utilizzando una combinazione di campioni di DNA con genotipo noto. Un controllo di amplificazione interno (IAC) per verificare il successo dell'amplificazione è incluso negli oligomix essiccati.

Per evitare reazioni false positive e false negative dovute alla contaminazione, si consiglia vivamente di inserire nel test un controllo negativo con acqua distillata. A tal fine, preparare un test senza DNA (NTC), si veda il capitolo 6.4.

## 12 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Sintomo	Possibile causa	Potenziale soluzione
<b>Segnale scarso o assente</b>	Presenza di un inibitore.	Utilizzare reagenti freschi.
	Nessun gDNA nella reazione.	Ripetere il test. Prestare attenzione al pipettaggio corretto.
	Parametri di amplificazione errati.	Controllare il programma PCR e la velocità di rampa.
	DNA contaminato o degradato.	Controllare la concentrazione / qualità del DNA. Controllare il DNA su un gel. Ripetere l'estrazione del DNA.






	Sonde o primer fluorescenti degradati.	Impiegare un nuovo kit ERY Q®. Evitare l'esposizione alla luce e frequenti scongelamenti e congelamenti. Prestare attenzione alle condizioni di conservazione.
	Bolle nella reazione PCR / liquido residuo sulla parete interna del tubo.	Eeguire un pipettaggio accurato. Centrifugare la piastra PCR.
	Evaporazione dei reagenti dovuta a chiusura errata delle provette PCR.	Assicurarsi che le provette per PCR siano chiuse correttamente. Prestare attenzione alla chiusura con pellicole adesive ai bordi.
<b>Segnale nel controllo negativo</b>	Contaminazione con DNA.	Ripetere il controllo negativo. Se viene rilevato di nuovo un segnale, decontaminare il luogo di lavoro e ripetere il test.

### 13. NOMI COMMERCIALI UTILIZZATI

TaqMan® è un nome commerciale di Roche Molecular Systems Inc.

® Cal Fluor e Quasar Dyes sono marchi registrati di LGC Biosearch Technologies

**14. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI SULLE ETICHETTE**

	Sufficiente per n test
	Temperatura di conservazione / Limite inferiore di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Utilizzare entro
	Fabbricante
<b>eIFU   VXX / XXXX</b>	Istruzioni per l'uso elettroniche Versione delle istruzioni per l'uso effettive
<b>IVD</b>	Per uso diagnostico in vitro
<b>LOT</b>	Codice lotto
<b>CONT</b>	Contenuto, contiene
<b>BLOOD TYPING</b>	Per la tipizzazione del gruppo sanguigno in base all'uso previsto
<b>HNA TYPING</b>	Per la determinazione delle specificità dell'HNA
<b>HPA TYPING</b>	Per la determinazione delle specificità HPA
<b>REF</b>	Numero di catalogo
<b>PCRSTRIP</b>	Strisce PCR
<b>PCRSTRIP / 1</b>	Strisce PCR per le mix 1-8 di ERY Q® AB0 variant
<b>PCRSTRIP / 2</b>	Strisce PCR per le mix 9-16 di ERY Q® AB0 variant
<b>REACTIONMIX</b>	Miscela di reazione
<b>PCRCAP</b>	Tappi per PCR
<b>RTU</b>	Pronto all'uso
<b>PLEX MIX</b>	Mastermix, contiene dNTP, Taq Polimerasi, tampone di reazione

**15. BIBLIOGRAFIA**

1. Sacchetti et al., 1997. Clin Chem 43: 2204-2206
2. Edwin Liu et al., 2005. Gastroenterology 128: 33.37
3. Husby et al., 2012. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition 54: 136-160
4. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9: 166
5. Mack et al., 2003, Tissue Antigens 81: 194-203

Vedere le istruzioni per l'uso in altre lingue su <http://www.bag-diagnostics.com> oppure contattare direttamente a [info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com) o telefonando al +49 (0) 6404-925-125



**BAG Diagnostics GmbH**

Amtsgerichtsstr. 1-5  
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404/925-100  
Fax: +49 (0) 6404/925-460

[www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)  
[info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com)

**Ordering:**

Tel.: +49 (0) 6404/925-450  
Fax: +49 (0) 6404/925-460  
[order@bag-diagnostics.com](mailto:order@bag-diagnostics.com)

**Customer Service:**

Tel.: +49 (0) 6404/925-125  
Fax: +49 (0) 6404/925-421  
[service@bag-diagnostics.com](mailto:service@bag-diagnostics.com)