

Istruzioni per l'uso

ERY SPOT[®] SSO Kits

Kit per test di tipizzazione gruppo ematica in biologia molecolare

IVD

REF 728510: ERY SPOT[®] Common (96 Test)	CE 0123
REF 728511: ERY SPOT[®] Common (24 Test)	CE 0123
REF 728520: ERY SPOT[®] Rare (96 Test)	CE
REF 728521: ERY SPOT[®] Rare (24 Test)	CE
REF 726098: HISTO SPOT[®] Reagent Kit	CE

Indice

1. DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	2
2. PRINCIPIO DEL TEST	2
3. MATERIALI.....	3
3.1 Contenuto dei kit di tipizzazione ERY SPOT [®] Common	3
3.2 Contenuto degli HISTO SPOT [®] Reagent kit.....	3
3.3 Reagenti e dispositivi richiesti e non inclusi nel kit	4
4. CONSERVAZIONE E STABILITA'	4
5. PROCEDIMENTO DEL TEST.....	5
5.1 Precauzioni di sicurezza e note speciali.....	5
5.2 Estrazione del DNA.....	5
5.3 Amplificazione.....	6
5.3.1 Preparazione della primer solution.....	6
5.3.2 Allestimento della PCR	6
5.3.3 Esecuzione della PCR	6
5.4 Test automatizzato di ibridazione su MR.SPOT [®]	7
5.4.1 Preparazione dei reagenti.....	7
5.4.2 Preparazione di MR.SPOT [®]	8
5.4.3 Trasferimento dei risultati ad un PC per l'interpretazione	8
5.4.4 Interpretazione dei risultati.....	8
6. AVVERTENZE E PRECAUZIONI	9
7. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	10
7.1 Validazione	10
8. LIMITI DEL METODO	11
9. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO.....	11
10. PROBLEMI E SOLUZIONI.....	12
11. MARCHI REGISTRATI UTILIZZATI NEL PRESENTE DOCUMENTO.....	12
12. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI PRESENTI SULLE ETICHETTE.....	13

Versione: 2/2016 – Edita: 2016-05

1. DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il sistema ERY SPOT® SSO è un test di diagnostica in vitro per la tipizzazione gruppo ematica in biologia molecolare. Consiste dei kit di tipizzazione ERY SPOT®, dei kit reagenti HISTO SPOT®, dello strumento automatico MR.SPOT® per l'esecuzione dei test e del software interpretativo HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Module.

I kit di tipizzazione ERY SPOT® contengono tutti i componenti necessari all'allestimento della reazione di PCR e i pozzetti test sul fondo dei quali sono immobilizzate probe oligonucleotidiche sequenza-specifiche per la rilevazione dei prodotti di PCR. Il kit reagenti HISTO SPOT® consiste dei reagenti necessari alle fasi di ibridazione e rilevazione e possono essere usati in combinazione con i kit di tipizzazione ERY SPOT®. Lo strumento MR.SPOT® è stato appositamente realizzato per il processamento contemporaneo da uno a 96 campioni, rendendo il processo di ibridazione, rilevazione dei risultati del tutto automatico. Per l'interpretazione dei risultati è necessario il software HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Module.

I kit ERY SPOT® sono in grado di rilevare in biologia molecolare gli alleli indicati nella tabella 1:

Tabella 1

Prodotto	Alleli gruppo ematici
ERY SPOT® Common REF 728510 REF 728511	GYPA*01 (MNS*1) GYPA*02 (MNS*2) GYPA*03 (MNS*3) GYPA*04 (MNS*4) KEL*01:01 KEL*02 JK*01 JK*02 FY*01 FY*02 FY*null FY*weak
ERY SPOT® Rare REF 728520 REF 728521	DI*01 DI*02 CO*01:01 CO*02 DO*01 DO*02 KEL*02:06 KEL*02:07 KEL*02:03 KEL*02:04 LU*01 LU*02 Vel/SMIM1 reference (Vel+) Vel/SMIM1 64-80del (Vel-)*

*La variante SMIM1 64-80del (Vel-) viene determinata da ERY SPOT® Rare indirettamente dalla mancata rilevazione di SMIM1 (Vel+).

2. PRINCIPIO DEL TEST

Il test può essere diviso in quattro fasi principali:

- Estrazione del DNA
- Amplificazione tramite PCR

- ibridazione e rilevazione
- interpretazione dei dati.

Sul campione clinico è necessario procedere all'estrazione del DNA, utilizzando un qualsiasi metodo validato nel proprio laboratorio o un kit commerciale. Il DNA viene quindi amplificato con un programma di PCR locus specifica e una reazione che si avvale di vari reagenti già compresi nel kit (Primermix, Primer Solvent, Masttermix). La specificità dell'amplificazione è determinata da un insieme di primer biotinilati che sono stati disegnati in modo da garantire l'amplificazione univoca del gruppo sanguigno prescelto. Dopo l'amplificazione, la piastra PCR contenente gli ampliconi marcati con biotina viene trasferita sullo strumento MR.SPOT®. MR.SPOT® aggiunge il tampone di ibridazione ad ogni pozzetto e trasferisce ogni amplicone (diluito in questo tampone) in un pozzetto test sul fondo del quale sono immobilizzate delle probe oligonucleotidiche sequenza-specifiche (SSO). L'amplicone marcato con biotina si lega a quelle sonde SSO che contengono una sequenza target complementare e il legame può successivamente essere evidenziato da una reazione colorimetrica. Per prevenire il legame aspecifico dell'amplicone sulla superficie del pozzetto test, MR.SPOT® provvede a saturare i pozzetti stessi tramite un tampone di bloccaggio prima di trasferirvi l'amplicone.

A seguito di una fase di lavaggio stringente volta alla rimozione di tutti gli ampliconi non legati, viene aggiunto nel pozzetto il coniugato streptavidina-fosfatasi alcalina, che si lega all'amplicone marcato con biotina e legato alla sonda SSO. Dopo ulteriori lavaggi, si aggiunge il substrato BCIP/NBT che viene convertito in un prodotto dal colore blu-porpora grazie all'azione enzimatica della fosfatasi alcalina. Il pattern di punti colorati risultante sul fondo di ciascun pozzetto test viene fotografato da MR.SPOT® e l'immagine viene trasmessa al software HISTO MATCH residente sul PC dell'operatore. Il software di analisi di immagine HISTO MATCH determina l'intensità di ciascun punto nell'array e ne confronta il livello rispetto al background. Da questi dati si evincono le reazioni positive e negative. Il software HISTO MATCH confronta il pattern di ibridazioni con quello atteso per ogni determinato allele di gruppo sanguigno presente nel campione e quindi determina il risultato.

3. MATERIALI

3.1 Contenuto dei kit di tipizzazione ERY SPOT® Common

Testwells|XXX **Pozzetti test*** confezionati singolarmente in una strip composta da 8 test, contenenti sonde oligonucleotidiche sequenza-specifiche immobilizzate

Mastermix|ERY **Mastermix****, pronta all'uso, contenente dNTPs, Taq polimerasi, tampone di reazione

Primermix|XXX **Primermix**, contenente primer biotinilati essiccati specifici per il gruppo sanguigno scelto

SOLV|PR|XXX **Primer solvent**, pronto all'uso.

XXX = COM (per ERY SPOT® Common)

RAR (per ERY SPOT® Rare)

In ogni kit è incluso un CD contenente le istruzioni per l'uso dei kit SSO ERY SPOT®, del Modulo SSO HISTO MATCH ERY SPOT® e il manuale d'uso per MR.SPOT®. In aggiunta il CD include il file batch da acquisire nel database del software di interpretazione di HISTO MATCH (per ulteriori dettagli si vedano le istruzioni d'uso del software HISTO MATCH ERY SPOT® Module).

* ogni kit può contenere pozzetti test da sublotti differenti.

** La mastermix può essere impiegata con tutti i kit ERY SPOT® ed è lotto-indipendente e viene inviata separatamente in confezione refrigerata. Ordinando un kit con 96 test verrà inviata una mastermix [REF](#) 728500 (4 x 125 µl), mentre ordinando un kit con 24 test verrà inviata una mastermix [REF](#) 728501 (1 x 125 µl).

Per ogni kit si definiscono inoltre lotti e batch nel seguente modo:

- **Kit:** es. **ERY SPOT®**
- **Lotto:** definisce lo schema spaziale e le specificità delle sonde legate sul fondo dei pozzetti reattivi di ciascun kit. Ogni singolo lotto può essere prodotto in batch differenti (sublotti)
- **Batch (Sublotto):** definisce la reattività di ogni sonda rispetto alle sonde di controllo (valori di cut off), è specifico per ogni data produzione, ed è caratterizzato da una precisa data di scadenza.

3.2 Contenuto degli HISTO SPOT® Reagent kit

I reagenti contenuti in un kit sono sufficienti per 96 test. Ogni kit contiene:

BLOCKBUF **Tampone di bloccaggio**, pronto per l'uso, contiene 0,001% Proclin® 150

HYBBUF **Tampone d'ibridazione**, pronto per l'uso, contiene 0,001% colorante, 0,1% sodio dodecilsolfato, 0,001% Proclin® 150

STRGWASH **Soluzione di lavaggio stringente**, pronto per l'uso, contiene 0,001% colorante, 0,1% sodio dodecilsolfato, 0,001% Proclin® 150

TBSWASH **Soluzione di lavaggio TBS** (Tris Buffered Saline), pronto per l'uso, contiene 20 mM Tris, 0,003% colorante, 0,001% Proclin® 150

SUBS **Substrato BCIP® / NBT**, pronto per l'uso
(5-Bromo-4-Cloro-3-Indolilfosfato / Nitrofluorotetracloruro)

CONJ **Coniugato**, Streptavidina e fosfatasi alcalina, concentrato, contiene sodio azide < 0,1% (Diluizione: 1:1666 in tampone di bloccaggio)

3.3 Reagenti e dispositivi richiesti e non inclusi nel kit

- Processore MR.SPOT®, incluso il software HISTO MATCH, [REF](#) 726100
- Puntali per pipette per MR.SPOT®, da 1000 µl [REF](#) 726099 e da 200 µl [REF](#) 726097
- Reagenti per l'estrazione di DNA (si sconsiglia l'uso del metodo salting out)
- Piastre PCR skirted con tappini o film adesivo (HISTO SPOT® PCR Frameplates, [REF](#) 726220, HISTO SPOT® PCR Caps, [REF](#) 726090, HISTO SPOT® PCR Foils, [REF](#) 726089)
- Termociclatore
- Acqua deionizzata
- Pipette a volume variabile (range 0,5 – 1000 µl) e puntali consumabili

4. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I pozzetti test, la primermix e il primer solvent sono spediti a temperatura ambiente e devono essere mantenuti a una temperatura tra i +2 °C e + 8 °C dopo ricevimento. La mastermix viene spedita in confezioni refrigerate e deve essere conservata a ≤ 20°C dopo ricevimento. La data di scadenza è indicata sull'etichetta di ciascun componente del kit ed è valida per i reagenti correttamente conservati e tenuti sigillati. La data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione esterna fa riferimento a quella del componente con stabilità minore contenuto nel kit. La mastermix può essere utilizzata con tutti i kit ERY SPOT® ed è lotto indipendente, inoltre può avere una scadenza più ravvicinata.

Le strip singole da 8 pozzetti possono essere aperte, ne può essere impiegato il numero di test richiesti per la seduta desiderata strappandoli dalla strip. I pozzetti inutilizzati possono essere nuovamente conservati nel foil di alluminio e impiegati per usi futuri. I pozzetti test conservati in foil di alluminio già aperti devono essere utilizzati entro 30 giorni dall'apertura. La soluzione di primermix risospesa deve essere conservata a una temperatura tra i +2 °C e + 8 °C e utilizzata entro 3 mesi. La diluizione del coniugato deve essere preparata sempre fresca prima di ogni test.

5. PROCEDIMENTO DEL TEST

5.1 Precauzioni di sicurezza e note speciali

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

Le attuali linee guida per la medicina trasfusionale

Per minimizzare il rischio di false tipizzazioni, occorre seguire le linee guida per la medicina trasfusionale e tenere conto dell'anamnesi del soggetto da cui proviene il campione in esame, in particolare nel caso di discrepanze tra i risultati ottenuti con la metodica in sierologia e biologia molecolare. Nel caso in cui con gli ERY SPOT® kit non si ottengano risultati chiari (ad es. nel caso di alleli sconosciuti che non possono essere determinati dalle sonde o primer esistenti) occorre applicare le linee guida trasfusionali attuali ai risultati ottenuti con metodica serologica e il genotipo dovrebbe essere determinato attraverso sequenziamento.

I risultati del test devono inoltre essere valutati considerando la variabilità genetica dei differenti gruppi etnici. In caso di dubbi, prendere come riferimento il fenotipo determinato dalla serologia.

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).
- ◆ Separare l'area di lavoro della pre-amplificazione (estrazione del DNA ed allestimento delle reazioni) da quella della post-amplificazione (ibridazione e rivelazione). Preferibilmente, utilizzare due stanze separate.
- ◆ L'amplificato non deve essere riportato nell'area pre-PCR.
- ◆ Utilizzare dispositivi ed altri materiali solo in posti fissi e prescelti e non cambiarli.

5.2 Estrazione del DNA

Si raccomanda l'impiego di un kit di estrazione certificato CE-IVD. Una metodica comunemente utilizzata nel proprio laboratorio dovrebbe essere validata dall'utente; evitare l'impiego di metodiche di salting out quando possibile.

Il campione di partenza per l'estrazione di DNA genomico dovrebbe essere inviato in un apposito contenitore per la raccolta di sangue. La presenza di eparina è causa potenziale di inibizione della PCR; pertanto, si consiglia di raccogliere il sangue in provette con EDTA o citrato. I campioni di DNA estratti dovrebbero avere una concentrazione di circa 15-30 ng/µl.

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

5.3.1 Preparazione della primer solution

Aggiungere 120 µl di primer solvent ad ogni provetta contenente la primermix essicata per risospenderla e vortexare bene. Lasciar riposare la soluzione per 15 minuti a temperatura ambiente e quindi mescolare nuovamente fino al completo scioglimento della primermix.

Nota:

- I primer essiccati devono essere completamente risospesi prima di iniziare il test.
- La soluzione risospesa dei primer deve essere conservata a una temperatura tra i +2 °C e + 8 °C ed impiegata entro 30 giorni.

5.3.2 Allestimento della PCR

Impiegare solo piastre PCR di tipo skirted per l'amplificazione, poiché dovranno essere successivamente alloggiare e bloccate all'interno dello strumento MR.SPOT®. A questo scopo sono state validate le HISTO SPOT® PCR Frameplates, piastre PCR di altri fornitori devono essere validate prima dall'utente.

Far sciogliere la mastermix. Durante il pipettamento conservare la mastermix in ghiaccio o blocco refrigerato. La mastermix deve essere mescolata con una pipetta prima dell'uso: **non vortexare**.

5.3.3 Esecuzione della PCR

Per ogni campione da amplificare aggiungere in una provetta PCR i seguenti componenti:

- 4 µl Mastermix
- 11 µl Primer solution
- 5 µl DNA campione (15-30 ng/µl)

Il volume totale di ogni reazione di amplificazione è di 20 µl.

Nota: è importante che la concentrazione del DNA sia nel range indicato tra i 15 e i 30 ng/µl. Concentrazioni maggiori possono generare reazioni false positive sulle sonde e concentrazioni inferiori viceversa possono causare mancanza d'amplificazione. Nel caso in cui si intendano utilizzare campioni congelati, evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelo.

Per il **controllo negativo** preparare una reazione di PCR con acqua distillata in luogo del campione di DNA.

Chiudere le provette da PCR con tappini o foglietti adesivi, effettuare una rapida centrifugata per raccogliere tutto il liquido sul fondo di ogni pozzetto, posizionarle nella griglia del termociclatore e procedere con l'amplificazione secondo il seguente programma:

Fase del programma	Tempo	Temperatura	N° di cicli
Prima denaturazione	2 Min	96°C	1 ciclo
Denaturazione	15 Sec	96°C	10 cicli
Annealing + Estensione	60 Sec	65°C	
Denaturazione	10 Sec	96°C	20 cicli
Annealing	50 Sec	61°C	
Estensione	30 Sec	72°C	
Attesa	∞	22°C	

Le condizioni sono identiche per tutti i termociclatori, tuttavia il tempo totale richiesto per l'amplificazione varierà a seconda della velocità di ramping dello specifico strumento in uso.

I kit ERY SPOT® SSO sono stati validati coi seguenti modelli di termociclatore:
Eppendorf: Mastercycler EP Gradient S (utilizzare l'impostazione "simulate Mastercycler Gradient")
Sensoquest Labcycler Gradient (Sensoquest) (utilizzare la ramp rate di 2°C/sec)
Biometra T professional 96.

Si consiglia l'impiego di blocchi in oro od argento.

Qualora si utilizzino altri tipi di termociclatore o di termoblocchi (ad es. blocchi in alluminio), l'operatore dovrà validarli per la metodica ERY SPOT SSO, in modo da escludere risultati falsi. Si raccomanda generalmente una ramp rate pari a 1-2°C/sec.

Una volta che la fase di amplificazione è stata completata, i campioni possono essere immediatamente processati o tenuti in frigorifero (tra +2°C e +8 °C) fino a 3 giorni.

Non è necessario controllare l'amplificazione su gel, anche perché il risultato del test potrebbe essere comunque buono sebbene si veda solo una banda molto debole su gel.

5.4 Test automatizzato di ibridazione su MR.SPOT®

5.4.1 Preparazione dei reagenti

Prelevare i reagenti HISTO SPOT® ed i pozzetti test ERY SPOT® fuori dal frigorifero, lasciarli equilibrare a temperatura ambiente.

Potrebbero essere visibili cristalli di sale nel tampone di ibridazione e nella soluzione di lavaggio stringente. Nel caso in cui siano presenti tali precipitati, scaldare le soluzioni a 30 °C fino a completo scioglimento. Attenzione: scaldare l'intera soluzione, non solo un'aliquota.

Il coniugato dev'essere diluito nel tampone di bloccaggio ad 1:6666. La diluizione del coniugato dev'essere sempre preparata fresca al momento prima di ogni test.

Vortexare e quindi eseguire un breve spin della provetta del coniugato prima di procedere allo step di diluizione!

I volumi richiesti dei reagenti variano a seconda del numero di strip o pozzetti da testare. MR.SPOT® indica in automatico le quantità richieste in base al numero delle strip. Riempire i serbatoi corrispondenti con i volumi richiesti per ciascun reagente.

Posizionare i pozzetti test e la piastra da PCR nei loro alloggiamenti su MR.SPOT®.

ATTENZIONE:

- Prestare particolare attenzione al corretto posizionamento della piastra da PCR.
- Assicurarsi che il segno sulla parte esterna del fondo del pozzetto test corrisponda al colore indicato sull'immagine che compare a video sullo schermo di MR.SPOT®.

Assicurarsi che non ci siano particelle di polvere o plastica nell'alloggiamento della piastra di reazione, poiché potrebbero disturbare il trasferimento di calore durante l'ibridazione.

Le strip dei pozzetti test possono essere separate in pozzetti singoli seguendo le istruzioni nella figura 1, nel caso in cui si debba eseguire un numero di test inferiore ad otto. Nel caso in cui si utilizzino pozzetti separati fare attenzione che siano posizionati in modo corretto nell'alloggiamento, senza che sia bloccato l'inserimento dai pozzetti vicini.

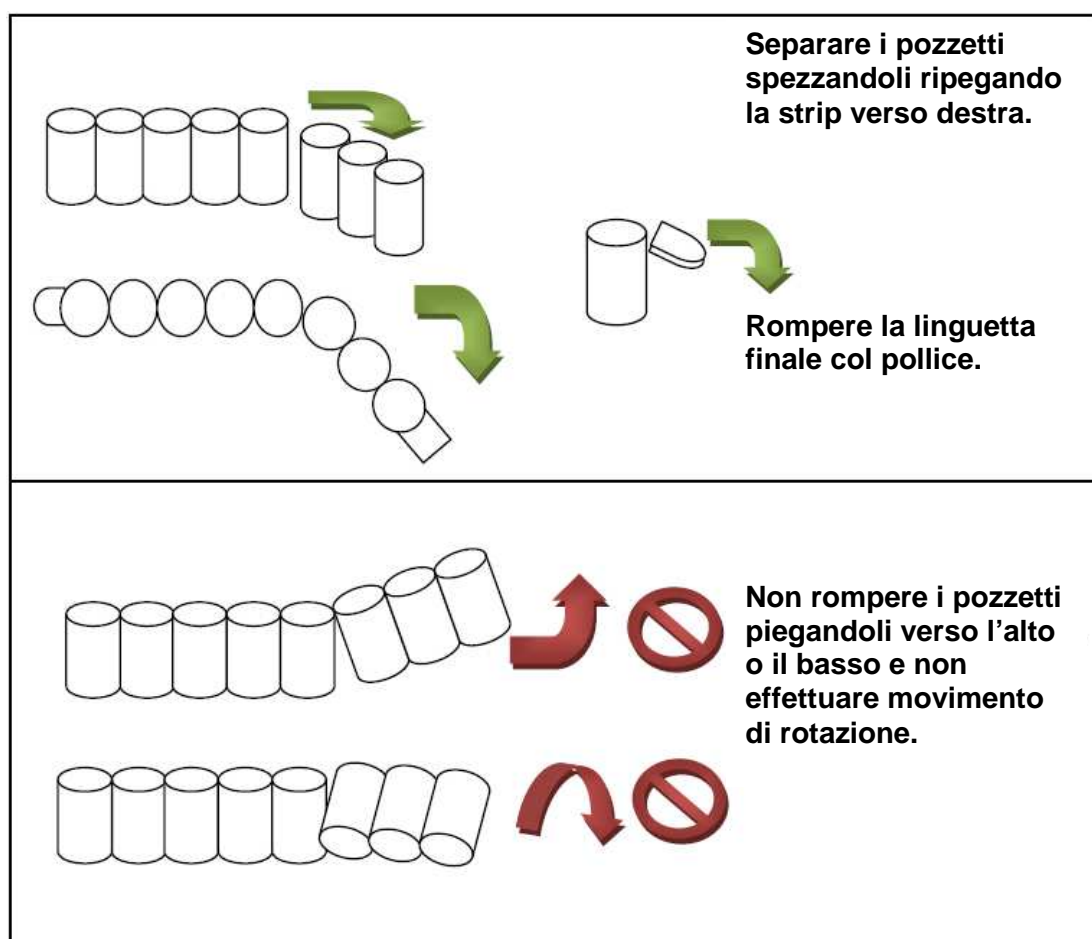


Fig. 1: Spezzamento di una test-strip

5.4.2 Preparazione di MR.SPOT®

Accendere lo strumento Mr.SPOT®, il PC interno e il touch screen. Quando compare la finestra di avvio, procedere come indicato nelle istruzioni a video. Nel manuale d'uso dello strumento MR.SPOT® queste operazioni sono descritte in modo dettagliato.

Attenzione: lo strumento Mr.SPOT® e i relativi reagenti devono essere tenuti lontani dalla luce solare diretta.

5.4.3 Trasferimento dei risultati ad un PC per l'interpretazione

Trasferire i dati al software interpretativo HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Module attraverso un cavo di rete o con una chiavetta USB, come descritto nel manuale del software.

5.4.4 Interpretazione dei risultati

Avviare il software HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Module (può essere installato, qualora non lo fosse, dal CD inviato insieme allo strumento) e procedere con l'interpretazione dei risultati come descritto nel manuale software.

Le immagini dovrebbero risultare come nella figura 2; la figura 3 fornisce lo schema illustrativo del risultato e delle funzioni delle diverse sonde.

Il colore dei cerchi attorno alle sonde indica la loro funzione (si vedano le istruzioni d'uso dettagliate del software nel manuale HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Module).

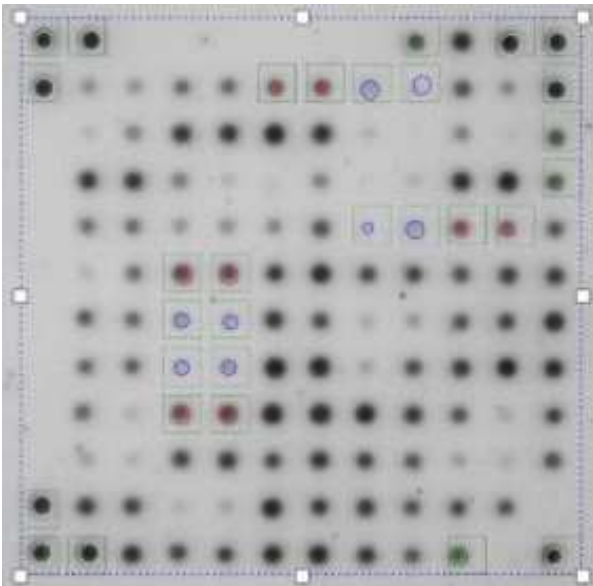
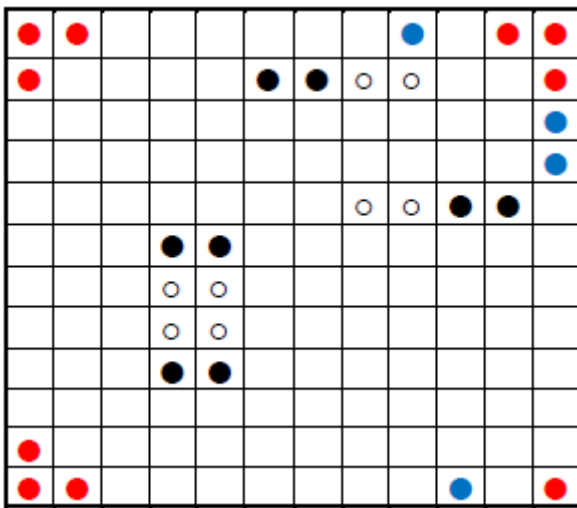


Figura 2: Immagine di un risultato per HLA A



●: Sonde posizionali: reagiscono con i primer di amplificazione ed indicano quindi che il prodotto di PCR e tutti i reagenti sono stati aggiunti. Inoltre, consentono al software di localizzare l'immagine.

●: Controllo di amplificazione in duplicato. Queste sonde sono universali per tutti gli alleli del locus rispettivo e mostrano che la PCR ha funzionato. Servono anche come riferimento d'intensità per le sonde allele specifiche.

●: Sonda allele specifica positiva in doppio.

○: Sonda allele specifica negativa in doppio.

Figura 3: Illustrazione schematica dei risultati e funzioni delle sonde

6. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

ERY SPOT® SSO 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. tessuti o 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).

Il tampone di bloccaggio, di ibridazione, di lavaggio stringente e il TBS contengono ProClin®150 mentre la soluzione di magnesio cloruro contiene ProClin®300. La concentrazione di ProClin®300

(0.001%) è molto bassa, si consiglia comunque di evitare il contatto con la pelle e le membrane mucose.

La soluzione del coniugato contiene sodio azide come conservante. La concentrazione di sodio azide è < 0.1%, che non è considerata dannosa. Tuttavia, si consiglia di evitare il contatto con la pelle e le membrane mucose: il sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame e formare metalli esplosivi. Quando si eliminano le soluzioni con sodio azide attraverso gli scarichi del laboratorio, far scorrere una quantità cospicua di acqua in modo da evitare la reazione suddetta.

Maneggiare i reagenti richiede delle opportune precauzioni: indossare una protezione per gli occhi, camice da laboratorio e guanti consumabili. Evitare il contatto di questi materiali con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con acqua abbondante. In caso di mancato trattamento potrebbero manifestarsi delle bruciature.

Nel caso di fuoriuscite accidentali di reagenti, diluire prima con acqua e quindi pulire l'area contaminata. Non mettere in contatto il reagente "Substrate" con metalli o agenti ossidanti.

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.

Le schede di sicurezza (**MSDS**) possono essere scaricate dal sito www.bag-healthcare.com.

7. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

7.1 Validazione

Per i kit ERY SPOT® SSO Common e Rare è stato condotto un lavoro di studio delle prestazioni con campioni di DNA a tipizzazione nota. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con altre metodiche certificate CE (ad es. SSP, serologia) e sequenziamento. Tutti i campioni testati e le specificità di gruppo sanguigno hanno mostrato una concordanza con risultato precedentemente ottenuto pari al 100%.

Per i prodotti corrispondenti a quanto contenuto nell'allegato II della lista A IVDD (ERY SPOT® SSO Common) sono stati condotti degli studi di esterni ed interni della valutazione delle prestazioni da parte di personale qualificato in diversi centri di donazione sangue e laboratori medici, e nei laboratori di BAG, rispettivamente. In totale sono stati testati ed analizzati 623 campioni random per il KEL*01.01. Le tipizzazioni ottenute hanno fornito una corrispondenza del 100% con le pre-tipizzazioni in molecolare già precedentemente condotte. Per i campioni precedentemente testati in serologia la corrispondenza era risultata pari al 98,5%. Si vedano le Tabelle 2 e 3.

Tabella 2

Kell Serologia			KEL*01.01 SSO			KEL*01.01 SSP		
Numero di campioni testati	Numero delle specificità positive	Numero delle specificità negative	Numero di campioni testati	Numero di alleli positivi	Numero di alleli negativi	Numero di campioni testati	Numero di alleli positivi	Numero di alleli negativi
328	49 [#]	277 [#]	328	48	280	328	48	280
89	5	84	89	5	84			
86	22	64	86	22	64			
			120	3	117	120	3	117

risultati discrepanti con SSO / Due campioni hanno mostrato risultati serologici ambigui e pertanto sono stati esclusi della valutazione.

Tabella 3

Concordanza (%)			
SSP con SSO		Serologia con SSO	
Alleli positivi	Alleli negativi	Specificità positive	Specificità negative
100%	100%	98,0%	98,9%

8. LIMITI DEL METODO

Poiché variazioni nella concentrazione e qualità del DNA hanno grande influenza sulla resa della reazione di PCR, occorre usare campioni di DNA che mostrano una concentrazione di almeno 15 ng/μl e valori di purezza adeguati (rapporto di assorbanze OD_{260}/OD_{280} compreso tra 1.5 e 2.0; $OD_{260}/OD_{230} > 1.8$).

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 in ogni test.

L'ibridazione è un processo critico per la temperatura. Pertanto, i kit ERY SPOT® SSO sono da usare solo in combinazione con il processatore automatico MR.SPOT® per assicurare tempi e temperature di incubazione corretti.

Tutti gli strumenti e dispositivi (ad es. pipette, termociclatori, blocchi riscaldanti, MR.SPOT®) devono essere calibrati secondo le istruzioni del produttore. In particolare, l'uniformità e l'accuratezza dei termociclatori può essere verificata con il kit BAG Cycler Check ([REF](#) 7104).

9. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Il controllo di qualità interno dei nuovi lotti di ERY SPOT® SSO può essere eseguito utilizzando una combinazione di campioni di DNA con gruppo sanguigno noto.

In ogni pozzetto test sono inseriti dei controlli positivi interni, allo scopo di verificare che la PCR sia avvenuta in modo corretto e si sia verificata l'ibridazione.

Si raccomanda l'uso dei controlli negativi per controllare le possibili contaminazioni. Come controllo negativo, allestire una reazione di PCR senza DNA per ogni test di ibridazione successivo.

10. PROBLEMI E SOLUZIONI





Sintomo	Possibili problemi	Soluzioni potenziali
Malfunzionamento dello strumento	Numerosi	Fare riferimento al manuale di MR.SPOT®
Messaggio d'errore durante trasferimento dati	Fallimento nel trasferimento dati	Trasferire manualmente i dati con chiavetta USB
Nessun risultato	La griglia non è correttamente sovrapposta all'immagine Diluizione errata coniugato Amplificazione quasi o totalmente fallita a causa di concentrazione non ottimale o frammentazione del DNA Malfunzionamento dello strumento MR.SPOT®	Procedere manualmente alla sovrapposizione della griglia Ripetere il test Controllare su gel la concentrazione di DNA Controllare la temperatura di ibridazione sullo strumento
Nessuno spot nel pozzetto	Mancata aggiunta di mastermix alla reazione PCR	Ripetere l'intero test
Solo gli spot di controllo sono positivi	Non è stato aggiunto il DNA per la PCR o non è avvenuta amplificazione	Ripetere l'intero test
Sonde false positive	Troppo DNA o concentrazione di coniugato elevata (mancato spin)	Verificare la concentrazione di DNA, spinnare il coniugato prima dell'utilizzo
Nessun risultato / risultati inconsistenti a causa di basso segnale	Errore nella diluizione del coniugato Amplificazione quasi o totalmente fallita a causa di concentrazione non ottimale o frammentazione del DNA Malfunzionamento dello strumento MR.SPOT®	Ripetere il test. Controllare la temperatura d'ibridazione Controllare su gel la concentrazione di DNA Controllare la temperatura di ibridazione sullo strumento

11. MARCHI REGISTRATI UTILIZZATI NEL PRESENTE DOCUMENTO

Proclin® è un marchio registrato della Rohm and Haas

BCIP® è un marchio registrato di Sigma Aldrich Co.

12. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI PRESENTI SULLE ETICHETTE

IVD	Per uso diagnostico in vitro
	Temperatura di conservazione
LOT	Numero lotto
	Utilizzare entro
REF	Numero di catalogo
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene quantità sufficiente per n test
BLOOD TYPING	Destinazione d'uso: tipizzazione gruppo ematica
Mastermix ERY	Mastermix per amplificazione di alleli di gruppo sanguigno con kit SSO ERY SPOT®
Primermix COM	Primermix per amplificazione di alleli di gruppo sanguigno con kit SSO ERY SPOT® Common
Primermix RAR	Primermix per amplificazione di alleli di gruppo sanguigno con kit SSO ERY SPOT® Rare
SOLV PR COM	Primer Solvent per kit SSO ERY SPOT® Common
SOLV PR RAR	Primer Solvent per kit SSO ERY SPOT® rARE
Testwells COM	Pozzetti test con sonde immobilizzate per la tipizzazione di alleli di gruppo sanguigno con kit SSO ERYSPOT® Common
Testwells RAR	Pozzetti test con sonde immobilizzate per la tipizzazione di alleli di gruppo sanguigno con kit SSO ERYSPOT® Rare
BLOCKBUF	Tampone di bloccaggio
HYBBUF	Tampone d'ibridazione
STRGWASH	Soluzione di lavaggio stringente
TBSWASH	Soluzione di lavaggio TBS (Tris buffered saline)
SUBS	Substrato BCIP® / NBT
CONJ	Coniugato, Streptavidina – Fosfatasi alcalina
ERY SPOT® INFORMATION CD	CD che include Istruzioni d'uso per kit SSO ERY SPOT®, per HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Module, Manuale d'uso di MR.SPOT®, file batch

Per istruzioni d'uso in altre lingue visitare il sito:

<http://www.bag-healthcare.com>

o chiamare il numero +49 (0) 6404-925-125