

DE

Gebrauchsinformation

# ERY SPOT<sup>®</sup> SSO Kits

Elektronische Gebrauchsinformation s. [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com)

Testkits zur Typisierung von Blutgruppen-Merkmalen auf molekulargenetischer Basis

IVD

<b>REF</b> 728510: ERY SPOT <sup>®</sup> Common (96 Tests)	CE	€0123
<b>REF</b> 728511: ERY SPOT <sup>®</sup> Common (24 Tests)	CE	€0123
<b>REF</b> 728520: ERY SPOT <sup>®</sup> Rare (96 Tests)	CE	€
<b>REF</b> 728521: ERY SPOT <sup>®</sup> Rare (24 Tests)	CE	€
<b>REF</b> 728540: ERY SPOT <sup>®</sup> Weak D-TYPE (96 Tests)	CE	€0123
<b>REF</b> 728541: ERY SPOT <sup>®</sup> Weak D-TYPE (24 Tests)	CE	€0123
<b>REF</b> 726098: HISTO SPOT <sup>®</sup> Reagent Kit	CE	€

**Version: 3/2017 / Stand: 2017-08** Änderungen gegenüber Version 2/2016 sind gelb markiert!

**Inhalt**

1.	PRODUKTBESCHREIBUNG .....	3
2.	TESTPRINZIP.....	3
3.	MATERIAL.....	4
3.1	Inhalt der ERY SPOT® Typisierungskits.....	4
3.2	Inhalt des HISTO SPOT® Reagent Kits.....	5
3.3	Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte.....	5
4.	LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	5
5.	TESTDURCHFÜHRUNG .....	6
5.1	Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise .....	6
5.2	DNA Isolation.....	6
5.3	Amplifikation.....	7
5.3.1	Vorbereitung der Primerlösung .....	7
5.3.2	Vorbereitung des PCR-Ansatzes .....	7
5.3.3	Durchführung der Amplifikation.....	7
5.4	Automatisierter Hybridisierungs-Assay auf dem MR.SPOT® Prozessor .....	8
5.4.1	Reagenzienvorbereitung.....	8
5.4.2	Start des MR.SPOT® Prozessors, Datentransfer und Analyse der Ergebnisse.....	9
5.4.3	Interpretation der Ergebnisse.....	10
6.	WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE .....	11
7.	LEISTUNGSMERKMALE.....	12
7.1	Leistungsbewertung.....	12
7.1.1	ERY SPOT® Common .....	12
7.1.2	ERY SPOT® Rare.....	13
7.1.3	ERY SPOT® Weak D-TYPE.....	13
8.	GRENZEN DER METHODE .....	13
9.	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE .....	14
10.	VERWENDETE MARKENNAMEN.....	14
11.	LITERATUR.....	14
12.	PROBLEMBEHANDLUNG.....	15
13.	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN .....	16
14.	ANHANG 1.....	17

## 1. PRODUKTBESCHREIBUNG

Das ERY SPOT<sup>®</sup> System ist ein In-vitro-Diagnostikum zum spezifischen und qualitativen Nachweis von Allelen des Kell-, Kidd-, Duffy-, MNS-Systems und seltenen Blutgruppensystemen sowie von Allelen des Rhesus-D Antigens auf molekulargenetischer Basis. Die Produkte werden verwendet zur Typisierung von Blutgruppen-Merkmalen sowie zur Abklärung, Bestätigung und Ergänzung von serologischen Befunden mit Hilfe der PCR-Technik (Polymerase-Ketten-Reaktion) und der Hybridisierung von Oligonukleotiden (SSO-Technik).

Das System besteht aus den genortspezifischen ERY SPOT<sup>®</sup> Typisierungskits, dem HISTO SPOT<sup>®</sup> Reagent Kit, dem MR.SPOT<sup>®</sup> Prozessor und der HISTO MATCH ERY SPOT<sup>®</sup> SSO Modul Interpretations-Software.

Der ERY SPOT<sup>®</sup> Typisierungskit enthält alle für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) benötigten Komponenten und die Testgefäße mit den gebundenen sequenz-spezifischen Oligonukleotidsonden für den Nachweis der PCR-Produkte. Der HISTO SPOT<sup>®</sup> Reagent Kit enthält die Reagenzien für die Hybridisierung und die Detektion der PCR Produkte. Der MR.SPOT<sup>®</sup> Prozessor wurde speziell für die automatische Hybridisierung und Detektion entwickelt. Es können zwischen 1 und 96 Tests gleichzeitig bearbeitet werden. Die HISTO MATCH ERY SPOT<sup>®</sup> SSO Modul Software wird für die Interpretation der Ergebnisse benötigt.

Siehe Punkt 14 Anhang 1 für die Liste der nachgewiesenen Allele durch die ERY SPOT<sup>®</sup> Typisierungskits.

## 2. TESTPRINZIP

Der Test umfasst vier grundlegende Schritte:

- DNA Isolation
- PCR Amplifikation
- Hybridisierung und Detektion
- Daten-Interpretation

Die DNA Isolation der Probe wird mit der im Labor etablierten Methode oder mit kommerziellen Kits durchgeführt. Anschließend wird die DNA in einer genortspezifischen PCR mit den im Kit enthaltenen Reagenzien (Primermix, Primer-Solvent, Mastermix) amplifiziert. Die Spezifität der Amplifikation wird durch biotinylierte Primer sichergestellt, die speziell zur selektiven Amplifikation des gewünschten Genortes entwickelt wurden. Nach der PCR Amplifikation wird die PCR Platte mit den Biotin-markierten Amplikons in den MR.SPOT<sup>®</sup> Prozessor überführt. MR.SPOT<sup>®</sup> pipettiert Hybridisierungspuffer in jedes PCR-Gefäß und überträgt die Amplikons zusammen mit dem Hybridisierungspuffer in die Testgefäße mit den immobilisierten sequenz-spezifischen Oligonukleotid (SSO) Sonden. Die Biotin-markierten Amplikons binden an die Sonden, die eine komplementäre Sequenz enthalten und werden mittels Farbreaktion nachgewiesen. Um eine unspezifische Bindung der Amplikons an den Gefäßböden zu verhindern, werden die Testgefäße vor der Zugabe der Amplikons mit Blockingpuffer blockiert. In einem stringenten Waschschrift wird ungebundenes Amplikon vollständig entfernt. Dann erfolgt die Zugabe eines Streptavidin-Alkalischen-Phosphatase-Konjugats, welches sich an das gebundene, Biotin-markierte Amplikon anlagert. Nach weiteren Waschschriften wird BCIP/NBT Substrat zugegeben, welches von der Alkalischen-Phosphatase in ein dunkelblaues Präzipitat umgewandelt wird. Die so gebildeten Farbpunkte werden im MR.SPOT<sup>®</sup> Prozessor fotografiert. Die Bild- und Assayinformationen werden in die HISTO MATCH ERY SPOT<sup>®</sup> SSO Modul Software importiert. Das Bild-Analyseprogramm der Software bestimmt die Intensität jedes Punktes und vergleicht sie mit der Intensität des Hintergrunds. Aus diesen Daten werden die positiven und negativen Reaktionen berechnet. Das Allel-Zuordnungsprogramm der HISTO MATCH ERY SPOT<sup>®</sup> SSO Modul Software ermittelt anschließend die Blutgruppenmerkmale anhand spezifischer Hybridisierungsmuster.

### 3. MATERIAL

#### 3.1 Inhalt der ERY SPOT® Typisierungskits

Der Inhalt der ERY SPOT® Typisierungskits ist abhängig von der Anzahl Tests je Kit. Eine detaillierte Aufstellung zum Inhalt der ERY SPOT® Typisierungskits finden Sie in Tabelle 1.

**Tabelle 1**

Bestandteil***	Beschreibung	Inhalt 24er Kit	Inhalt 96er Kit
Testwells XXX	Testgefäße*, einzeln verpackt, jeder Streifen enthält 8 Tests, enthalten fixierte sequenzspezifische Oligonukleotid Sonden	3x	12x
Primermix XXX	Primermix, vorgetrocknet, enthält biotinylierte Primer für den jeweiligen Genort. Jedes Röhrchen ist ausreichend zur Durchführung von 8 Tests.	3x	12x
SOLV PR XXX	Primer Solvent, gebrauchsfertig. Die Menge des Primer Solvents in jedem Röhrchen reicht für die Resuspendierung von sechs getrockneten Primermischen aus.	1x	2x
Mastermix ERY	Mastermix**, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer. Die Menge an Mastermix in jedem Röhrchen reicht aus, um 24 Tests durchzuführen.	1x	4x
ERY SPOT® INFORMATION CD	In jedem Kit befindet sich eine CD mit den Gebrauchsinformationen für die ERY SPOT® SSO Kits und für das HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Modul, dem MR.SPOT® Handbuch und dem Batch File zum Import in die HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Modul Auswertesoftware (siehe Gebrauchsinformation für das HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Modul).	1x	1x

\* In einem Kit können Testgefäße von mehreren Sublots enthalten sein.

\*\* Der Mastermix wird separat mit Kühlelementen geliefert. Bei der Bestellung eines Kits mit 96 Tests wird der Mastermix **REF** 728500 (4 x 125 µl) mitgeliefert und bei Bestellung eines Kits mit 24 Tests der Mastermix **REF** 728501 (1 x 125 µl). Der Mastermix kann mit allen ERY SPOT® Typisierungskits chargenunabhängig verwendet werden.

\*\*\* XXX = COM (für ERY SPOT® Common)  
RAR (für ERY SPOT® Rare)  
RWD (für ERY SPOT® Weak D-TYPE)

Für jeden Kit gibt es Lots und Batches:

- **Kit:** z.B. ERY SPOT®
- **Lot:** definiert die Anordnung und die Spezifität der Sonden in einem Kit. Jedes Lot kann viele verschiedene Batches (Sublots) umfassen.
- **Batch (Sublot):** definiert, wie die Sonden im Vergleich zur Kontrollsonde reagieren (Schwellenwerte) und hat ein definiertes Herstellungs- und Verfallsdatum.

### 3.2 Inhalt des HISTO SPOT® Reagent Kits

Die Reagenzien in einem Kit sind ausreichend für 96 Typisierungen. Eine detaillierte Aufstellung zum Inhalt des HISTO SPOT® Reagent Kits finden Sie in Tabelle 2.

**Tabelle 2**

Bestandteil	Beschreibung
<b>BLOCKBUF</b>	<b>Blockingpuffer</b> , gebrauchsfertig. Enthält 0,001% Proclin® 150.
<b>HYBBUF</b>	<b>Hybridisierungspuffer</b> , gebrauchsfertig. Enthält 0,001% Farbstoff, 0,1% Natriumdodecylsulfat, 0,001% Proclin® 150.
<b>STRGWASH</b>	<b>Stringente Waschlösung</b> , gebrauchsfertig. Enthält 0,001% Farbstoff, 0,1% Natriumdodecylsulfat, 0,001% Proclin® 150.
<b>TBSWASH</b>	<b>TBS Waschlösung</b> (Tris Buffered Saline), gebrauchsfertig. Enthält 20 mM Tris, 0,003% Farbstoffe, 0,001% Proclin® 150.
<b>SUBS</b>	<b>BCIP® / NBT Substrat</b> , gebrauchsfertig. (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat / Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat</b> , Streptavidin Alkalische Phosphatase, Konzentrat. Enthält < 0,1% Natriumazid (Verdünnung: 1:1666 in Blockingpuffer).

### 3.3 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- MR.SPOT® Prozessor, inklusive HISTO MATCH Software, REF 726100
- Pipettenspitzen für den MR.SPOT® Prozessor, 1000 µl REF 726099 und 200 µl REF 726097
- Reagenzien zur DNA Isolation (keine Aussalzungsmethode)
- PCR Platten mit Rand und passende Deckel oder PCR-Folie (HISTO SPOT® PCR Frameplates REF 726220, HISTO SPOT® PCR Caps REF 726090, HISTO SPOT® PCR Foils REF 726089)
- Deionisiertes Wasser / Ampuwa
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen
- Thermocycler

## 4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Die Packung mit den Testgefäßen, dem Primermix und dem Primer Solvent wird ungekühlt versandt. Der Mastermix wird mit Kühlelementen versandt. Die Testgefäße, der Primermix und das Primer Solvent müssen bei 2...8°C gelagert werden. Der Mastermix muss nach Erhalt bei ≤ -20°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett der jeweiligen Reagenzien angegeben und gilt für die ungeöffneten Verpackungen. Das Verfallsdatum auf dem Außenetikett der Packung mit den bei 2...8°C zu lagernden Kit-Bestandteilen bezieht sich auf das Reagenz in der Packung mit der kürzesten Haltbarkeit. Der Mastermix kann mit allen ERY SPOT® Typisierungskits chargenunabhängig eingesetzt werden und kann ein kürzeres Verfallsdatum haben.

Einzelne Teststreifenpackungen können geöffnet werden und die benötigte Anzahl Tests kann vom Teststreifen abgebrochen werden. Die unbenutzten Gefäße zurück in den Aluminiumbeutel legen und innerhalb von 30 Tagen verbrauchen. Die gelösten Primermixe bei 2...8°C lagern und ebenfalls innerhalb von 30 Tagen verbrauchen. Die anderen Reagenzien sollten nach dem Öffnen innerhalb von drei Monaten verbraucht werden. Die Konjugat-Verdünnung muss für jeden Lauf frisch angesetzt werden.

## 5. TESTDURCHFÜHRUNG

### 5.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Molekulargenetische Techniken sind besonders sensitive Methoden und sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal mit Erfahrung in molekulargenetischen Techniken durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Tests dürfen nicht als alleinige Grundlage für klinische Entscheidungen verwendet werden. Insbesondere müssen die Transfusionsrichtlinien (aktuelle Richtlinien zur Transfusionsmedizin und Blutgruppenbestimmung) sowie die Transfusionsanamnese berücksichtigt werden, um das Risiko falscher Typisierungen, insbesondere bei Diskrepanzen zwischen serologischen und molekulargenetischen Methoden, zu minimieren. Sollte kein eindeutiges Ergebnis mit den ERY SPOT<sup>®</sup> Kits erzielt werden (z.B. durch bis jetzt unbekannte Allele, die mit den vorhandenen Primern bzw. Sonden nicht erfasst werden), sind Transfusionsrichtlinien (z.B. Richtlinien der Bundesärztekammer) entsprechend den serologischen Befunden zu beachten. Eine Sequenzierung solcher Proben zur Abklärung des Genotyps ist zu empfehlen. Die Testergebnisse sind mit Berücksichtigung der genetischen Varianz unterschiedlicher ethnischer Gruppen zu bewerten. Im Zweifelsfalle gilt der Phänotyp.

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 (Hybridisierung, Detektion); möglichst zwei getrennte Räume nutzen
- ◆ Amplifikate dürfen nicht zurück in den Prä-PCR Bereich gebracht werden.
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen

### 5.2 DNA Isolation

Es wird empfohlen, bei der DNA-Isolation  $\text{C}\epsilon\text{I}\text{V}\text{D}$  zugelassene Extraktionskits zu verwenden. Sollte die bereits im Labor etablierte Standardmethode zur Isolation von gDNA verwendet werden, ist diese vom Kunden zu validieren. Nach Möglichkeit keine Aussalzungsmethode verwenden.

#### **Validierte DNA Extraktionsmethoden:**

- QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini und Maxi Kit

Das Probenmaterial für die Isolation der genomischen DNA sollte in geeigneten Abnahmesystemen verschickt werden. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen, derartige Abnahmesysteme sind daher nicht geeignet. Es wird der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen. Für den Test wird eine DNA Konzentration von 15-30 ng/ $\mu\text{l}$  benötigt (s. Punkt 5.3.3).

Die Reinheitsindices sollten sich im folgenden Bereich befinden:

- Extinktionsverhältnis  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  :  $>1.5$  und  $<2.0$   
Höhere Werte deuten auf das Vorhandensein von RNA hin, niedrigere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen.
- Extinktionsverhältnis  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{230}$  :  $>1,8$   
Niedrigere Werte deuten auf eine Kontamination mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln hin.

## 5.3 Amplifikation

### 5.3.1 Vorbereitung der Primerlösung

Die Primermixe lösen. Dazu in jedes Reaktionsgefäß mit vorgetrocknetem Primermix 120 µl Primer Solvent geben, sorgfältig mischen (z.B. vortexen), ca 15 Minuten stehen lassen und noch einmal mischen bis die Primermixe vollständig resuspendiert sind.

#### Hinweis:

- Die getrockneten Primermixe müssen vor Testbeginn vollständig resuspendiert sein.
- Die Primerlösungen bei 2...8°C lagern und innerhalb von 30 Tagen verbrauchen.

### 5.3.2 Vorbereitung des PCR-Ansatzes

Es sollten PCR Platten mit Rand verwendet werden, da die Platten im MR.SPOT<sup>®</sup> Prozessor durch einen auf dem Rand aufsitzendem Rahmen fixiert werden. HISTO SPOT<sup>®</sup> PCR Frameplates wurden für diese Anwendung validiert. PCR Platten anderer Hersteller müssen vom Anwender validiert werden.

Den Mastermix auftauen. Während des Pipettiervorganges auf Eis oder im Kühlblock lagern. Vor dem Pipettieren mischen (nicht vortexen).

### 5.3.3 Durchführung der Amplifikation

Für jede Probe werden die folgenden Reagenzien in ein PCR-Gefäß pipettiert:

- 4 µl Mastermix
- 11 µl Primerlösung
- 5 µl DNA (15-30 ng/µl)

Das Reaktionsvolumen für jede Amplifikation beträgt 20 µl.

**Hinweis:** Es ist wichtig, dass die Gesamtmenge an DNA pro Einzeltestung zwischen 75 und 150 ng liegt. Zu hohe oder niedrige DNA-Mengen pro Ansatz können zu falsch-positiven oder falsch negativen Reaktionen der Sonden führen, niedrigere Konzentrationen zu Amplifikationsausfällen. Wenn eingefrorene DNA-Proben eingesetzt werden sollen, wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden.

Wenn eine **Negativkontrolle** mitgeführt werden soll, eine PCR Reaktion mit destilliertem Wasser anstatt der Proben-DNA ansetzen.

Die PCR Gefäße mit Deckeln oder PCR Folie verschließen und die PCR-Ansätze kurz **herunterzentrifugieren**. Dann die PCR Gefäße in den Thermocycler **stellen und entsprechend dem Amplifikationsprotokoll in Tabelle 3 amplifizieren**.

**Tabelle 3**

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	2 Min	96°C	1 Zyklus
Denaturierung	15 Sek	96°C	10 Zyklen
Annealing + Extension	1 Min	65°C	
Denaturierung	10 Sek	96°C	20 Zyklen
Annealing	50 Sek	61°C	
Extension	30 Sek	72°C	
Hold	∞	22°C	

Die Bedingungen sind für alle Thermocycler dieselben, die benötigte Zeit für diesen Schritt kann jedoch in Abhängigkeit von der Heizrate des verwendeten Thermocyclers variieren.

Die folgenden Thermocycler Modelle wurden für ERY SPOT® SSO validiert:

- Eppendorf: Mastercycler® EP Gradient S (bitte die Einstellung „simulate Mastercycler Gradient“ verwenden)
- Sensoquest Labcycler Gradient (Fa. Sensoquest) (bitte Heizrate 2°C/sec verwenden)
- Biometra T professional 96
- Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler (bitte die Einstellung „9600“ Mode verwenden)

#### **Die Anwendung von Gold- und Silberheizblöcken wird empfohlen.**

Bei Verwendung anderer Thermocycler bzw. Heizblöcke (z.B. Aluminiumheizblöcke), müssen diese vom Anwender validiert werden, da sonst falsche Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können. Es wird generell empfohlen eine Heizrate von 1-2°C / Sekunde zu verwenden.

Nach der Amplifikation können die Proben sofort getestet oder bis zu 3 Tage ungeöffnet bei 2...8°C gelagert werden.

Die Durchführung einer Gelelektrophorese zur Amplifikationskontrolle ist nicht erforderlich. Es gibt keine direkte Korrelation zwischen der Intensität der Gel-Banden und den Ergebnissen des ERY SPOT® Assays. Eine schwache Gelbande kann einem eindeutigen Ergebnis in dem ERY SPOT® Assay entsprechen.

## **5.4 Automatisierter Hybridisierungs-Assay auf dem MR.SPOT® Prozessor**

### **5.4.1 Reagenzienvorbereitung**

HISTO SPOT® Reagenzien und ERY SPOT® Testgefäße aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur bringen.

Im Hybridisierungspuffer und in der stringenten Waschlösung können sich Salzkristalle bilden. Wenn dies der Fall ist, die komplette Lösung (kein Aliquot) auf 30°C erwärmen, um die Salzkristalle aufzulösen.

Das Konjugat 1:1666 in Blockingpuffer verdünnen. Die Konjugatverdünnung muss für jeden Lauf frisch angesetzt werden.

**Das Konjugat muss vor jedem Verdünnungsschritt gemixt und abzentrifugiert werden !**



Die erforderlichen Mengen an Reagenzien variieren entsprechend der Anzahl getesteter Streifen. MR.SPOT® zeigt die benötigten Volumina für die Reagenzien auf dem Bildschirm des Touchscreens an. Die angegebenen Volumina der benötigten Reagenzien in die entsprechend beschrifteten Vorratsgefäße füllen.

Die Testgefäße und die PCR Platte in die dafür vorgesehenen Blöcke des MR.SPOT® Prozessors stellen.

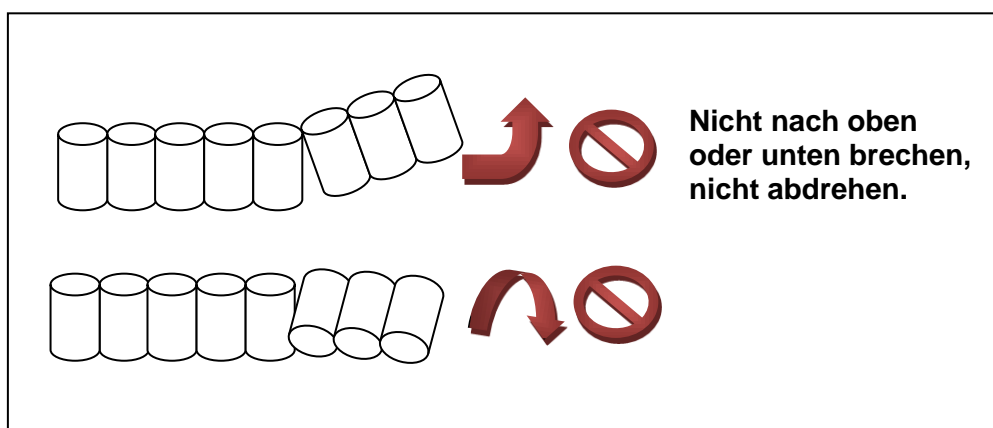
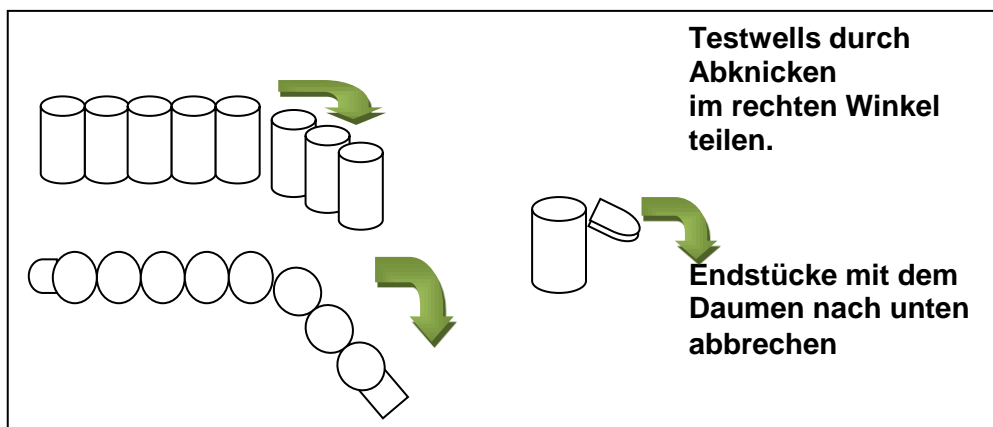
**ACHTUNG:**

- Bitte auf die richtige Ausrichtung der Testgefäße und der PCR Platte achten!
- Bitte stellen Sie sicher, dass die Farbmarkierung auf dem äußeren unteren Rand der Testgefäße dem Farbcode auf dem Bildschirm des MR.SPOT® Prozessors entspricht.

Bitte stellen Sie sicher, dass sich kein Schmutz oder Plastikteilchen im Reaktionsplattenhalter befinden, da diese die Temperaturübertragung während der Hybridisierung stören können.

Die Teststreifen können entsprechend Abbildung 1 in einzelne Testgefäße geteilt werden, wenn weniger als 8 Tests benötigt werden. Bei der Verwendung von geteilten Streifen muss darauf geachtet werden, dass die Streifen gut im Reaktionsplattenhalter stehen und nicht gegeneinander verkantet sind. Es müssen durchsichtige Dummy-Testgefäße hinzugefügt werden, um die Anzahl der Tests auf ein Vielfaches von Vier zu ergänzen.

**Abb. 1: Teststreifen teilen**



**5.4.2 Start des MR.SPOT® Prozessors, Datentransfer und Analyse der Ergebnisse**

Eine Arbeitsliste im HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Modul erstellen und anschließend zum MR.SPOT® Prozessor zur weiteren Verarbeitung schicken. Die Arbeitsliste kann über ein lokales Netzwerk direkt zu einem MR.SPOT® Prozessor geschickt werden oder der Transfer kann über einen USB Speicher erfolgen.

Den MR.SPOT® Prozessor anschalten, daraufhin erscheint der Start-Bildschirm. Die zu Beginn erstellte Arbeitsliste auswählen und den Anweisungen auf dem Bildschirm folgen.

Nach der Verarbeitung auf dem MR.SPOT® Prozessor muss die Arbeitsliste zusammen mit den Bildern der Testgefäße in das HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Modul für die Analyse der Ergebnisse importiert werden. Dies kann über ein lokales Netzwerk oder über einen USB Speicher erfolgen.

Eine detaillierte Beschreibung befindet sich im Benutzerhandbuch für den MR.SPOT® Prozessor und in der Gebrauchsinformation für das HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Modul.

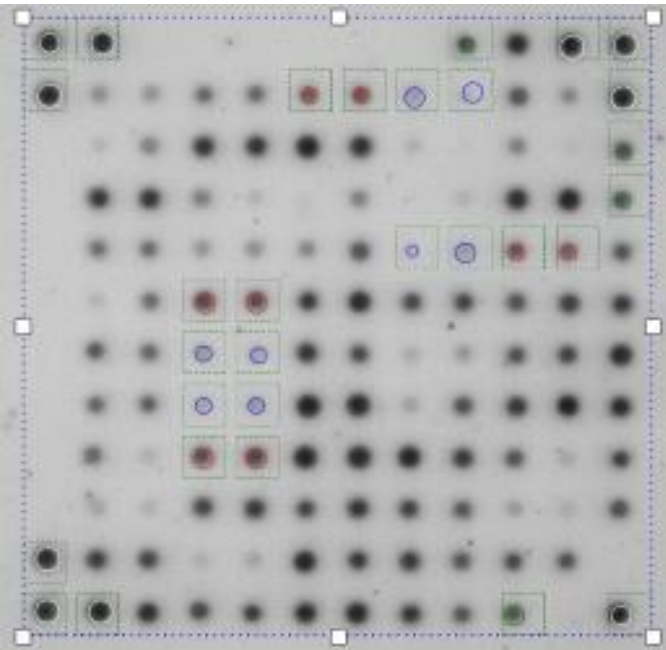
**Hinweis:** Der MR.SPOT® Prozessor und die Reagenzien sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden.

### 5.4.3 Interpretation der Ergebnisse

Die HISTO MATCH Software für das ERY SPOT® SSO Modul öffnen und die Daten, wie in der Gebrauchsinformation für das HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Modul beschrieben, auswerten. Die Installations-CD für die HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Modul Software wird mit dem MR.SPOT® Prozessor geliefert.

Exemplarisch ist das Reaktionsmuster für ERY SPOT® Common in den Abb. 2 und 3 dargestellt. Die Reaktionsmuster der einzelnen ERY SPOT® Kits können abweichend sein. Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung der Ergebnisse und die Funktion der verschiedenen Sonden.

**Abb. 2: Beispiel eines Reaktionsmusters (MNS) für ERY SPOT® Common**



Die Farbe der Kreise um die Sonden zeigt ihre Funktion an (siehe Gebrauchsinformation für die HISTO MATCH Software ERY SPOT® SSO Modul für weitere Informationen).

**Abb. 3: Schematische Illustration der Ergebnisse und Funktion der Sonden**

●	●								●		●	●
●					●	●	○	○				●
												●
												●
							○	○	●	●		
			●	●								
			○	○								
			○	○								
			●	●								
●												
●	●									●		●

●: Positionssonden: Diese Sonden reagieren mit den Amplifikationsprimern und zeigen an, dass die PCR-Ansätze korrekt transferiert und alle Reagenzien im SSO Assay korrekt zugegeben wurden. Darüber hinaus dienen sie der Software als Hilfspunkte zum Anlegen des Rasters (Gridding).

●: Amplifikationskontrollen als Duplikat. Diese Sonden sind universell für alle Allele des jeweiligen Genorts und zeigen an, dass die PCR erfolgreich war. Sie dienen außerdem als Referenz für die allelspezifischen Sonden.

●: Positive allelspezifische Sonde als Duplikat

○: Negative allelspezifische Sonde als Duplikat

## 6. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE

ERY SPOT® ist für den Gebrauch als In vitro Diagnostikum konzipiert und 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, sonstige Körperflüssigkeiten) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (u.a. nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien sollen 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).

Der Blockingpuffer, der Hybridisierungspuffer, die stringente Waschlösung und die TBS Waschlösung enthalten ProClin®150. Die Reagenzien enthalten nur 0,001% des Konservierungsmittels. Trotzdem ist es ratsam, den Kontakt mit Haut und Schleimhäuten zu vermeiden.

Das Konjugat enthält das Konservierungsmittel Natriumazid. Das Reagenz enthält < 0,1% Natriumazid. Diese Konzentration wird nicht als schädlich eingestuft. Trotzdem den Kontakt mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Natriumazid kann mit Blei und Kupferrohren reagieren und explosive Metallsalze bilden. Daher sollte bei der Entsorgung im Ausguss mit viel Wasser nachgespült werden.

Bei allen Arbeiten mit den Reagenzien sollten geeignete Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden. Beim Umgang mit den Reagenzien sollte Augenschutz, ein Laborkittel und Schutzhandschuhe getragen werden. Kontakt dieser Materialien mit der Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Bei Berührung sofort mit viel Wasser waschen. Bei Nichtbehandlung können Verbrennungen auftreten.

Wenn Reagenzien verschüttet werden, vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen. Das Substrat nicht mit Metallen und oxidierenden Stoffen in Berührung bringen.

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte 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.

## 7. LEISTUNGSMERKMALE

### 7.1 Leistungsbewertung

Für die ERY SPOT® Common, Rare und Weak D-TYPE 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.

Für Produkte gemäß IVDD Anhang II Liste A (ERY SPOT® Common und ERY SPOT® Weak D-TYPE) wurden die externen und internen Leistungsbewertungsstudien in verschiedenen Blutspende-Einrichtungen, medizinischen Laboren sowie in der BAG von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt.

#### 7.1.1 ERY SPOT® Common

Insgesamt wurden 623 unausgewählte Proben auf das Merkmal KEL\*01.01 getestet und analysiert. Die Typisierungen ergaben eine 100% Übereinstimmung zum molekulargenetischen Vortypisierungsergebnis. Zur Serologie ergab sich eine Übereinstimmung von mindestens 98,0%. Details siehe Tabelle 4 und 5.

**Tabelle 4**

Kell Serologie			KEL*01.01 SSO			KEL*01.01 SSP		
Anzahl getesteter Proben	Anzahl Merkmal positiv	Anzahl Merkmal negativ	Anzahl getesteter Proben	Anzahl Merkmal positiv	Anzahl Merkmal negativ	Anzahl getesteter Proben	Anzahl Merkmal positiv	Anzahl Merkmal negativ
328	49 <sup>#</sup>	277 <sup>#</sup>	328	48	280	328	48	280
89	5	84	89	5	84			
86	22	64	86	22	64			
			120	3	117	120	3	117

# abweichende Testresultate zu SSO / Bei zwei Proben lag kein eindeutiges serologisches Ergebnis vor und sie wurden deshalb aus der Bewertung der Serologie herausgenommen.

**Tabelle 5**

Übereinstimmungen (%)			
SSP mit SSO		Serologie mit SSO	
Merkmal positiv	Merkmal negativ	Merkmal positiv	Merkmal negativ
100%	100%	98,0%	98,9%

Für alle weiteren Merkmale (Kidd, Duffy und MNS) des ERY SPOT® Common Kits zeigte sich eine 100%ige Übereinstimmung der Testergebnisse mit den molekulargenetischen Referenztypisierungsergebnissen.

### 7.1.2 ERY SPOT® Rare

Im Vergleich zwischen ERY SPOT® Rare und den molekulargenetischen Referenzbestimmungen zeigte sich eine 100%ige Übereinstimmung bei allen Merkmalen.

### 7.1.3 ERY SPOT® Weak D-TYPE

Von den mit dem ERY SPOT® Weak D-TYPE Kit untersuchten Proben (n = 1078) wurden in der Summe aller Zentren insgesamt n = 847 Proben serologisch auf das Merkmal D typisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Übereinstimmung zwischen Testmethode und Referenzmethode Serologie betrug 96,7%.

**Tabelle 6**

	Anzahl getesteter Proben	BAG	Gesamt Extern 1-3
Gesamt untersucht (n)	1078	618	460
Davon serologisch (n)	847	477	370
Diskrepanz zur Serologie (n)	28	-	28
Übereinstimmung zur Serologie (%)	96,7%		

Von der Gesamtprobenzahl (n = 1078) wurden 311 Proben auf das Vorhandensein von Weak D-Allelen und 226 Proben auf das Vorhandensein von RHD\*01 molekulargenetisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Übereinstimmung zwischen Testmethode und Referenzmethode Molekulargenetik betrug 98,9%.

**Tabelle 7**

		Anzahl getesteter Proben	BAG	Gesamt Extern 1-3
Gesamt untersucht (n)		1078	618	460
davon molekulargenetisch (n)	RHD*01	226	226	-
	Weak D	311	230	81
Diskrepanz zur Referenzmethode Molekulargenetik (n)		6	1	5
Übereinstimmung zur Referenzmethode Molekulargenetik (%)		98,9%	\	\

## 8. GRENZEN DER METHODE

Sollte kein eindeutiges Ergebnis mit den ERY SPOT® 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 ist zu empfehlen. Die Testergebnisse sind mit Berücksichtigung der genetischen Varianz unterschiedlicher ethnischer Gruppen zu bewerten. Im Zweifelsfalle gilt der Phänotyp.

Hinweise auf nicht nachweisbare Allele beziehungsweise das Vorhandensein von Expressionsvarianten, wie z.B. Hybridallele RHDIIIa-CE(3-7)-D / DAU type 3, type 7) / partial-D (RHD\*DAU type 3) finden sich in der aktuellen Software. Diese Informationen sind im Untersuchungsreport dokumentiert.

Da die PCR Methode sehr anfällig auf Schwankungen der DNA Menge und Qualität reagiert, sollten nur DNA Proben verwendet werden, die eine Konzentration zwischen 15 und 30 ng/µl haben und deren Reinheitsindices entsprechen ( $OD_{260}/OD_{280}$ : zwischen 1.5 und 2.0 /  $OD_{260}/OD_{230}$ : >1,8).

Es sollte besonders darauf geachtet werden, Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplifikaten oder DNA zu vermeiden. Die regelmäßige Durchführung von Wischtests zum Nachweis von genomischer DNA (z.B. Wischtest, [REF] 7091) und die Mitführung einer Negativkontrolle mit jedem Testlauf werden empfohlen.

Der Hybridisierungsschritt ist ein temperatursensitiver Prozess. Daher sind die ERY SPOT<sup>®</sup> Kits nur in Kombination mit dem MR.SPOT<sup>®</sup> Prozessor zu verwenden, um die Einhaltung der korrekten Temperaturen und Inkubationszeiten zu gewährleisten.

Alle Geräte (z.B. Pipetten, Thermocycler, Heizblöcke, MR.SPOT<sup>®</sup> Prozessor) müssen entsprechend der Herstellervorgaben kalibriert werden. Die Genauigkeit und die Temperaturuniformität der Thermocycler können mit dem CYCLER CHECK ([REF] 7104, 71044) überprüft werden.

## 9. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots der ERY SPOT<sup>®</sup> SSO Kits können mit einer Kombination von DNA Proben mit bekannten Blutgruppenallelen durchgeführt werden.

Interne Positivkontrollen zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation und Hybridisierung sind in jedem Testgefäß enthalten.

Die Mitführung von Negativkontrollen zum Nachweis möglicher Kontaminationen wird empfohlen. Zu diesem Zweck wird eine PCR Reaktion ohne DNA angesetzt und im anschließenden Hybridisierungsassay als Negativkontrolle eingesetzt.

## 10. VERWENDETE MARKENNAMEN

Proclin<sup>®</sup> ist ein Markenname der Firma Rohm und Haas.

BCIP<sup>®</sup> ist ein Markenname der Firma Sigma Aldrich Co.




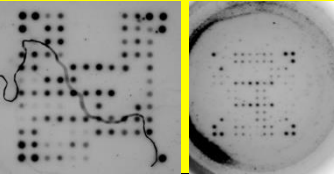
Mastercycler<sup>®</sup> ist ein Markenname der Firma Eppendorf AG.

Veriti<sup>™</sup> ist ein Markenname der Firma Applied Biosystems.














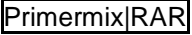




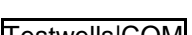
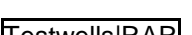








## 11. LITERATUR

- Daniels, G., *HUMAN BLOOD GROUPS*, Oxford, WILEY-BLACKWELL, 2013, ISBN: 978-1-4443-3324-4
- [www.rhesusbase.info/RHDDHMi.htm](http://www.rhesusbase.info/RHDDHMi.htm)
- <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>

**12. PROBLEMBEHANDLUNG**

Fehler	Mögliches Problem	Potentielle Lösung
Fehlfunktion des MR.SPOT® Prozessors	verschiedene	Siehe Manual für MR.SPOT® Prozessor
Fehlermeldung beim Datentransfer	Fehler beim Datentransfer	Daten manuell über einen USB Speicher übertragen
Kein Ergebnis	Fehler bei automatischer Lokalisation der Spots im Bild	Manuelle Lokalisation der Spots durchführen
	Fehler bei der Konjugat-Verdünnung	Test wiederholen
	Keine oder schlechte Amplifikation durch suboptimale DNA-Konzentration oder fragmentierte DNA	DNA-Konzentration überprüfen
	Fehlfunktion des MR.SPOT® Prozessors	Hybridisierungstemperatur am Gerät überprüfen
Keine Spots im Testgefäß 	Kein <b>Primermix</b> in der PCR	Test wiederholen
Nur die Positionssonden sind positiv 	Keine DNA <b>oder kein Mastermix</b> in der PCR oder Ausfall der Amplifikation	Test wiederholen
Falsch-positive Sonden	Zu viel DNA eingesetzt oder Konjugatkonzentration zu hoch (nicht zentrifugiert)	DNA Konzentration überprüfen, Konjugat vor dem Gebrauch abzentrifugieren
Kein Ergebnis / Widersprüchliches Ergebnis aufgrund schwacher Signale 	Fehler bei der Konjugatverdünnung	Test wiederholen
	Schlechte oder keine Amplifikation durch suboptimale DNA-Konzentration oder fragmentierte DNA	DNA-Konzentration überprüfen
	Fehler beim Mastermix-Volumen	Test wiederholen
	Fehlfunktion des MR.SPOT® Prozessors	Hybridisierungstemperatur am Gerät überprüfen
Kein Ergebnis / Widersprüchliches Ergebnis durch Verschmutzungen im Testgefäß 	Präzipitat oder Faser in dem Array	Test wiederholen

**13. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN**

Symbol	Beschreibung
	In-vitro-Diagnostikum
	Lagertemperatur / <b>Temperaturbegrenzung</b>
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Hersteller
	Elektronische Gebrauchsinformation
	Lot-Nr.
	Verwendbar bis
	Bestell-Nr.
	Gebrauchsinformation beachten
	Ausreichend für n Tests
	Zweckbestimmung: Blutgruppenbestimmung
	Mastermix für die Amplifikation der Blutgruppenallele mit ERY SPOT® SSO Kits
	Primermix für die Amplifikation von Blutgruppenallelen mit den ERY SPOT® Common Kits
	Primermix für die Amplifikation von Blutgruppenallelen mit den ERY SPOT® Rare Kits
	Primermix für die Amplifikation von Blutgruppenallelen mit den ERY SPOT® Weak D-TYPE Kits
	Primer Solvent für die ERY SPOT® Common Kits
	Primer Solvent für die ERY SPOT® Rare Kits
	Primer Solvent für die ERY SPOT® Weak D-TYPE Kits
	Testgefäße mit gebundenen Sonden für die Typisierung von Blutgruppenmerkmalen mit den ERY SPOT® Common Kits
	Testgefäße mit gebundenen Sonden für die Typisierung von Blutgruppenmerkmalen mit den ERY SPOT® Rare Kits
	Testgefäße mit gebundenen Sonden für die Typisierung von Blutgruppenmerkmalen mit den ERY SPOT® Weak D-TYPE Kits
	Blockingpuffer
	Hybridisierungspuffer
	Stringente Waschlösung
	TBS Waschlösung (Tris buffered saline)
	BCIP® / NBT Substrat
	Konjugat, Streptavidin Alkalische Phosphatase
	CD, enthält Gebrauchsinformation ERY SPOT® SSO Kits, Gebrauchsinformation HISTO MATCH ERY SPOT® SSO Modul, Handbuch MR.SPOT® Prozessor, Batch file



**14. ANHANG 1**

Produkt	Nachweis folgender Blutgruppen-Merkmale
ERY SPOT® Common REF 728510 REF 728511	GYPA*01 (MNS*1) GYPA*02 (MNS*2) GYPB*03 (MNS*3) GYPB*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	KEL*02.06 KEL*02.07 KEL*02.03 KEL*02.04 DI*01 DI*02 CO*01.01 CO*02 DO*01 DO*02 YT*01 YT*02 LU*01 LU*02 VEL*01 (Vel+)* VEL*-01 (Vel-)*
ERY SPOT® Weak D-TYPE REF 728540 REF 728541	RHD*01 (RHD pos) RHD*01N.01 (RHD neg) RHD*01W.1 (RHD*weak D type 1) RHD*01W.1.1 (RHD*weak D type 1.1) RHD*01W.2 (RHD*weak D type 2) RHD*01W.3 (RHD*weak D type 3) RHD*09.03.01,09.04 (RHD*DAR3.01,DAR4 ) RHD*09.01.00 (RHD*DAR1.00) RHD*09.02.01 (RHD*DAR 2.01) RHD*01W.5 (RHD*weak D type 5) RHD*11 (RHD*weak partial 11) RHD*15 (RHD*weak partial 15) RHD*01W.17 (RHD*weak D type 17) RHD*01W.20 (RHD*weak D type 20) RHD*08N.01 (RHD*Pseudogene)

\* Ersetzt die Nomenklatur: Vel/SMIM1 reference (Vel+); Vel/SMIM1 64-80del (Vel-)