

SV

Bruksanvisning

BAGene SSP Kits

För elektroniska instruktioner, se www.bag-diagnostics.com

Test kit för molekylärbioologisk bestämning av ABO, RH, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Rare (Ovanliga) blodgrupps system samt HPA och HNA specificiteter

Bruksfärdiga Pre-alikvoterade

REF	6640	ABO-TYPE
REF	6641	ABO-TYPE variant
REF	6645	RH-TYPE
REF	6646	Partial D-TYPE
REF	6647	Weak D-TYPE
REF	6650	KKD-TYPE
REF	6652	MNS-TYPE
REF	6653	Rare-TYPE
REF	6660	HPA-TYPE
REF	66701	HNA-TYPE

Innehållsförteckning

1. Produktbeskrivning	2
2. Material	2
2.2. Material som krävs men inkluderas ej	3
2.3. Förvaring och hållbarhet	3
3. Prestationsdata	3
4. Test utförande	4
4.1. Säkerhetsförhållanden och speciella anmärkningar	4
4.2. DNA isolering	4
4.3. Amplifiering	5
4.4. Gelelektrofores	7
4.5. Dokumentation	7
4.6. Tolkning av resultat och metodbegränsningar	7
4.6.1. Allmänt	7
4.6.2. ABO-TYPE och ABO-TYPE variant	8
4.6.3. RH-TYPE	8
4.6.4. Partial D-TYPE	9
5. Varningar och försiktighetsåtgärder	10
6. Felsökning	11
7. Referenser	11
8. Förklaring av förpackningssymboler	12

Version: 15/2020 / Utfärdad: 2020-10 Ändringar från version 14/2019 är gulmarkerade.

1. Produktbeskrivning

BAGene test-kit är in vitro-diagnostika för användning av kvalificerad personal. Testkiten används för bestämning av blodgruppsspecificiteter hos blodgivare, blodmottagare och gravida kvinnor på en molekylärbiologisk grund. ABO-, ABO-variant-, RH (med D Zygositet)-, Partial D-, Weak D- och KKD-kit fungerar till att komplettera, förtydliga och bekräfta serologiska resultat. MNS-, HPA-, HNA- och Rare (Sällsynta)- kit kan användas för molekylärbiologisk typning utan ytterligare serologiska tester, såvida inga sådana krav föreligger (se nationella bestämmelser).

Grundmaterialet för typning med BAGene-kit är renat leukocyt DNA. Testet utförs genom användning av Sequence Specific Primers (SSP)-PCR (se fig. 1). Denna metod baseras på primerförlängning, och därmed framgångsrik PCR, och förlitar sig på en exakt matchning vid 3'-ändan av båda primerna. Som ett resultat erhålls amplifieringen endast om primrarna helt matchar målsekvensen. Produkten från amplifieringen visualiseras därefter med agarosgel elektrofores.

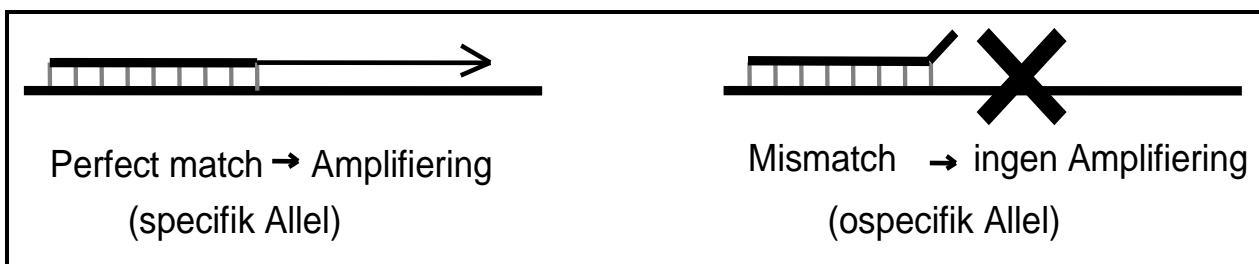


Fig. 1: Princip för SSP-PCR

Sammanställningen av de individuella primerblandningarna möjliggör tydlig identifiering av ABO, RH, KEL, JK, FY, MNS, ovanliga blodgrupper, HPA- och HNA-genotyper angivna på respektive arbetsblad. Ett visst antal för-alikvoterade reaktionsblandningar används per typning. En intern amplifieringskontroll ingår i varje reaktionsmix.

2. Material

2.1. Innehåll BAGene kit

- ◆ PCR-plattor/strips för blodgruppsgenotypning. Den för-alikvoterade och torkade reaktionsmixen består av allelspecifika primers, internkontroll primer (specifika för HGH-genen (Human Growth Hormone) eller för en sekvens av kromosomen I (90 kbp 5' av RhesusBox)) och nukleotider. Reaktionsmix nr 1 är markerad. Batchnumret är tryckt på varje platta/strip.
- ◆ 10x PCR buffert
- ◆ 8 strips-lock
- ◆ BAGene Information CD (innehåller bruksanvisning, arbetsblad och certifikat för kvalitetskontroll)

2.2. Material som krävs men inkluderas ej

- ◆ Happy Taq (REF 70976) (eller ett annat Taq-polymeras, validerat med BAGene-kit av användaren). Happy Taq levereras utan kostnad vid beställning av BAGene-kit. **Använd inte Hot-start Taq Polymerase (t.ex. Ampli Taq Gold)!**
- ◆ **EXTRA GEN I-kit** (REF 7059) (valfritt) för DNA-extraktion från blod/lymfocyter/leukocyter eller material för andra DNA-extraktionsmetoder
- ◆ Kolvpipetter (0.5 - 250 µl)
- ◆ Sterila spetsar med integrerat filter
- ◆ Termocykler (PCR-instrument) (lista över validerade termocykler, se sidan 6)
- ◆ DNA agaros
- ◆ 0.5x TBE buffert (45 mM Tris, 45 mM borsyra, 0.5 mM EDTA)
- ◆ Etidium bromide (EtBr)
- ◆ Enhet för submarinelektrofores
- ◆ Strömförsörjning (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA-längd **standard**
- ◆ UV-källa (transilluminator, 220-310 nm)
- ◆ Gel-dokumentationssystem

2.3. Förvaring och hållbarhet

BAGene-kit transporteras vid rumstemperatur. Happy Taq transporteras på torrisk. Efter leverans förvaras alla reagenser vid ≤ -20 °C. Utgångsdatum anges på etiketten för varje reagens och gäller även för öppnade förpackningar. Utgångsdatumet på den yttre etiketten avser reagenset med den kortaste hållbarheten i kitet.

Tina 10x PCR-bufferten strax före användning.

3. Prestationsdata

Sammansättningen av primermixen garanterar en tillförlitlig identifiering av de alleler som anges i arbetsbladet baserat på sekvensdata som för närvarande är kända.

Noggrannheten och reproducerbarheten av specificiteten för varje primermix har verifierats för varje batch med DNA-kontrollprover med kända specificiteter. Alleler, som inte ingår och som för närvarande inte testats på grund av deras sällsynthet, anges på arbetsbladet (nt = testas inte för närvarande).

Prestationsstudier med tidigare typade DNA-prover har genomförts för alla BAGene-kit. Vissa mixar kunde inte testas för en positiv reaktion eftersom de är specifika för sällsynta alleler som inte var tillgängliga för testning. Detta anges på arbetsbladet. Resultaten har jämförts med resultat erhållna med andra blodgrupps-SSP-kit, sekvensering eller serologiska metoder.

Typpningsresultaten har visat 100% överensstämmelse med tidigare typade resultat.

Evaluering och kvalitetskontroll av mixarna har gjorts med DNA-prover, som extraherats med EXTRA GEN I (utsaltningsmetod) eller Qiagen QIAamp DNA Blood Mini och Maxi-kit (kolonnbaserad metod). När en annan DNA-extraktionsmetod används måste användaren validera det extraherade DNA: s lämplighet för applikationen med BAGene-kit.

BAGene-kit är validerade med Happy Taq (REF 70976). Genom att använda ett annat Taq-polymeras måste enzymet valideras med BAGene-kiten av användaren.

En tillförlitlig typpning garanteras genom att använda 50 - 100 ng DNA per reaktionsmix.

4. Test utförande

4.1. Säkerhetsförhållanden och speciella anmärkningar

PCR är en mycket känslig metod som måste utföras av välutbildad personal med erfarenhet av molekylärbioologiska tekniker och blodgruppsserologiska tester. Uppdaterade riktlinjer inom transfusionsmedicin, blodgruppsbestämning och transfusions anamnes bör beaktas för att minska risken för falska typningar, särskilt när olika resultat uppnås med serologiska och molekylärbioologiska metoder. Genotypning av ABO-, RHD/RHCE-, Kell-, Kidd- och Duffy-specificiteter måste utföras efter serologiskt test.

Särskilda säkerhetsförhållanden måste noteras för att undvika kontaminering och därmed falska reaktioner:

- ◆ Använd skyddshandskar under arbetet (puderfria, om möjligt).
- ◆ Använd nya spetsar för varje pipetteringssteg (med integrerat filter).
- ◆ Använd separata arbetsområden för pre-amplifiering (DNA-isolering och beredning av reaktionerna) och post-amplifiering (gelelektrofores, dokumentation); använd helst två separata rum.
- ◆ Använd allt material på respektive plats och byt inte ut dem.

4.2. DNA isolering

Provmaterialet för isolering av genomiskt DNA skall skickas i lämpliga bloduppsamlingssystem. Heparin är en potentiell PCR-hämmare; därför är bloduppsamlingssystem med heparin inte lämpliga [2]. EDTA- eller citratblod rekommenderas.

Validerade DNA-extraktions metoder:

- EXTRA GENE I (BAG)
- QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini och Maxi Kit

Manuell isolering eller automatiserad DNA-isolering (QIAcube) är lämpliga.

Experiment med andra kit visade att eluering bör utföras med vatten (dubbeldestillerat vatten, DNase-fritt vatten) och inte med elueringsbuffertar. Speciellt för isoleringsmetoder med magnetiska beads, inhibering av PCR-reaktionen och följaktligen svaga band (dålig förstärkning) eller falskt negativa resultat observerades vid användning av elueringsbuffertar. Därför rekommenderas det att använda de validerade extraktionsmetoderna.

Andra standardmetoder för DNA-isolering etablerade på laboratoriet måste valideras av användaren.

DNA bör ha följande renhetsindex:

- $OD_{260}/OD_{280} = >1.5$ and <2.0 (indikerar kontaminering med RNA/proteiner)
- $OD_{260}/OD_{230} = >1.8$ (indikerar kontaminering med salt, kolhydrater eller organiska lösningsmedel)

4.3. Amplifiering

Samtliga pre-alikvoterade reaktionsmixar innehåller allel- och kontrollspecifika primrar och nukleotider. Dessa levereras torkade i reaktionsrören. Amplifieringsparametrarna är optimerade för en slutlig volym på 10 µl.

1. Ta ut det önskade antalet plattor/strips från frysen (≤ -20 °C) och tina 10x PCR-bufferten.
2. Pipettera mastermixen, bestående av 10x PCR-buffert, DNA-lösning, Taq-Polymerase och dest. vatten och blanda väl. De olika BAGene-kiten fungerar med samma mastermix och kan därför kombineras

Sammansättningen av mastermixen ges i tabell 1.

Tabell 1: Sammansättning av mastermix beroende på antal reaktionsblandningar

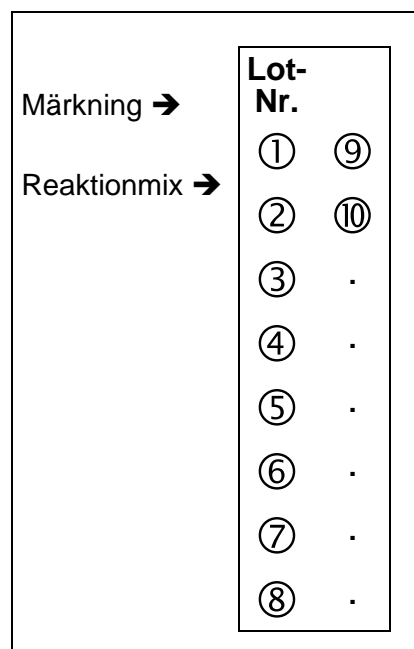
Antal blandningar	Dest vatten	10x PCR buffert	DNA lösning (50-100 ng/µl)	Happy Taq (5 U/µl)	Total volym
1	8	1	1	0,08	10 µl
2	16	2	2	0,2	20 µl
6☆	50	7	7	0,5	65 µl
7	70	9	9	0,7	90 µl
8	80	10	10	0,8	100 µl
9	88	11	11	0,9	110 µl
10	96	12	12	1,0	120 µl
11	104	13	13	1,0	130 µl
12	112	14	14	1,1	140 µl
13	128	16	16	1,3	160 µl
14	136	17	17	1,4	170 µl
15	144	18	18	1,4	180 µl
16	152	19	19	1,5	190 µl
18	166	21	21	1,7	210 µl

⇒ För olika DNA-koncentrationer måste mängden DNA-lösning och vatten varieras i enlighet med detta (t.ex. för 12 blandningar: DNA (120 ng/µl): använd 5,8 µl DNA och 119 µl dest vatten).

Om ett annat Taq-polymeras ska användas måste enzymet valideras med BAGene-kit av användaren

☆ Minsta beredning av mastermix till 6 reaktionsblandningar rekommenderas på grund av den låga volymen av Taq-Polymerase.

3. Tillsätt 10 µl av mixen omedelbart efter vortexblandning till de pre-alikvoterade och torkade reaktionsmixen (se figur). Byt pipettspets efter varje pipetteringssteg. Förslut rören ordentligt med respektive lock. Se till att du inte rör med fingrarna vid insidan av locken eller rörens övre kanter för att undvika kontaminering. Om termocykler med tätt förslutbart lock används är det också möjligt att använda återanvändbara PCR-mattor. Skaka plattan något nedåt för att lösa upp pelleten i botten på plattan. Den kompletta PCR-lösningen ska sätta sig i botten.
4. Placera reaktionsrören ordentligt i termocyklern och dra åt locket så att de inte snedvids vid uppvärmning. Starta PCR-programmet. Överlagring av reaktionsblandningarna med mineralolja krävs **inte** om ett uppvärmt och justerat lock används!



Amplifieringsparametrar för alla BAGene-kit.

Program-Steg	Tid	Temp.	Antal cykler
Första denaturering	5 Min	96°C	1 Cykel
Denaturering	10 Sec	96°C	5 Cykler
Hybridisering+Förlängning	60 Sec	70°C	
Denaturering	10 Sec	96°C	10 Cykler
Hybridisering	50 Sec	65°C	
Förlängning	45 Sec	72°C	
Denaturering	10 Sec	96°C	15 Cykler
Hybridisering	50 Sec	61°C	
Förlängning	45 Sec	72°C	
Slutlig förlängning	5 Min	72°C	1 Cykel

Validerade termocykler

- PTC 200 / C1000 (MJ Research/ BioRad)
- GeneAmp PCR-System 9700 (använd uppvärmnings-hastighet 9600), Veriti (ABI)
- Mastercycler epGradient S (använd funktionen "simulera Mastercycler - gradient")(Eppendorf)
- Tprofessional (Biometra)

Använd inte ett aluminiumvärmeblock (t.ex. GeneAmp PCR-System 9700)!

Vid användning av termocykler med mycket snabb uppvärmnings- och nedkylningshastighet rekommenderas att använda en långsammare uppvärmnings- och kylningshastighet (~2,5 °C/sek).

Eftersom termocykler från olika tillverkare fungerar olika och även termocykler av samma typ kan kalibreras på olika sätt kan det vara nödvändigt att optimera amplifieringsparametrarna.

Använd följande riktlinjer för att optimera din enhet:

Vid **falskt positiva** reaktioner (ospecifika band, ytterligare typer): Öka hybridiseringstemperaturen (eng. annealing) med 1 °C per steg.

Vid **falskt negativa** reaktioner (saknade band och/eller amplifieringskontroller): Sänk hybridiseringstemperaturen (eng. annealing) med 1 °C per steg och/eller öka hybridiseringsperioderna med 5 sekunder per steg och/eller öka denatureringsperioderna med 5 sekunder per steg.

Det rekommenderas att endast använda regelbundet kalibrerade termocykler. För kontroll av termocykler rekommenderas CYCLER CHECK-kitet (REF 7104, 71044).

4.4. Gelelektrofores

Separation av amplifieringsprodukterna sker genom elektrofores via en horisontell agarosgel. Som elektroforesbuffert rekommenderas 0,5x TBE (45 mM Tris, 45 mM borsyra, 0,5 mM EDTA) buffert. Gelkoncentrationen bör vara 2,0 - 2,5% agaros. Låt gelen polymerisera minst 30 minuter innan proven laddas.

När amplifieringen är klar, ta proverna ur termocyklern och ladda försiktigt reaktionsmixen i varje gelbrunn. Använd även en DNA-längdstandard för storleksjämförelse. Elektroforesseparation görs vid 10 - 12 V/cm (med 20 cm avstånd mellan elektroderna cirka 200 - 240 V), i 20 - 40 minuter. Efter att körningen har slutförts färgas gelen i en etidiumbromidlösning (EtBr) i 30 - 45 minuter (cirka 0,5 µg/ml av EtBr i H₂O- eller TBE-buffert). Som ett alternativ kan EtBr (0,5 µg/ml) också tillsättas till elektroforesbufferten eller agarosgelen. Vid behov kan överskott av EtBr avlägsnas genom att blötlägga gelen i H₂O i 20 - 30 minuter.

4.5. Dokumentation

För dokumentation, visualisera PCR- amplifieringen med en UV-transilluminator (220-310 nm) och fotografera den med ett lämpligt gel-dokumentationssystem. Välj exponeringstid och bländare så att banden dras skarpa och sticker ut mot den mörka bakgrunden (ungefärlig bländare 11, exponeringstid 1 sekund). Resultaten dokumenteras på det medföljande arbetsbladet (se punkt 4.6)

4.6. Tolkning av resultat och metodbegränsningar

4.6.1. Allmänt

Resultat som erhållits med BAGene-kiten dokumenteras på de medföljande arbetsbladen. På arbetsbladet anges egenskaper, specificiteter, fenotyper och genotyper i en tabell och exempel på ett reaktionsmönster finns som stöd för tolkning. PCR-beredningarna har reaktionsnummer (t.ex. ABO-TYPE-reaktion nr 1 - 8). Under reaktionsnumren i arbetsbladet anges fragmentlängden för de specifika PCR-produkterna i bp. Möjliga bandmönster i gelen visas i raderna under. Specifika PCR-produkter (positiva reaktioner) betecknas som **+** och motsvarande rutor i diagrammet har en färgad bakgrund. ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, Rare-TYPE, HPA-TYPE och HNA-TYPE är markerade i **grått**, RH-TYPE dessutom i **rött, grönt och blått**. Utvärderingen av reaktionsmönstren utförs radvis från vänster till höger. Endast band som visar rätt storlek i samband med DNA-längdstandarden bör betraktas som positiva. Rätt storlek på specifika ampliconer kan hittas på arbetsbladet. I alla rader utan allelspecifik förstärkning måste den interna kontrollen visas vid **434 bp**. Undantag är PCR-reaktionen med **mix nr. 2 av RH-TYPE** som visar en intern kontroll vid **659 bp**. I de flesta fall där

det finns allelspecifik förstärkning är den interna kontrollen svagare eller frånvarande! Om varken ett specifikt band eller det interna kontrollbandet visas kan resultatet med relevant mix inte användas för tolkning. För felaktiga resultat, se felsökning (se punkt 6.).

Om inget tydligt resultat kan uppnås med BAGene-kit (t.ex. på grund av okända alleler som inte kan detekteras med befintliga primrar), bör nationella transfusionsriktlinjer följas i enlighet med serologiska fynd. Sekvensering av dessa prover rekommenderas. Tynningsresultaten bör tolkas med hänsyn till den genetiska variansen hos olika etniska grupper. Vid tveksamhet är fenotypen giltig.

4.6.2. ABO-TYPE och ABO-TYPE variant

Det homozygota uttrycket av allelerna *ABO*O.01*, *ABO*O.02*, *ABO*B.01*, *ABO*A2.01* indikeras med band i motsvarande PCR-reaktion (1, 3, 5 eller 7). Vid heterozygositet måste alla fyra "icke-reaktioner" ha ett band i gelen (2, 4, 6 och 8) i tillägg till två specifika PCR-preparat (1, 3, 5, 7). Homozygositet hos allel *ABO*A1.01* indikeras endast av band i alla fyra "icke-reaktioner" (2, 4, 6, 8), eftersom det inte finns någon specifik preparering för *ABO*A1.01*. Den heterozygota mönstret av *ABO*A1.01* kan kännas igen genom ett ytterligare band av allelspecifika reaktioner (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 eller 16).

Eftersom endast ett urval av variant A-alleler kan detekteras av ABO-TYPE varianten, kan andra variant A-alleler döljas av PCR-resultatet ***ABO*A1.01***. Eftersom endast ett urval av variant B-alleler och ingen variant A²-alleler kan detekteras med ABO-TYPE-variant, kan andra variant B-alleler eller variant A²-alleler döljas av PCR-resultaten ***ABO*B.01*** respektive ***ABO*A2.01***. De flesta B^(A) och cis AB-allelerna visar också ett positivt resultat i *ABO*B.01*-reaktionen

Ett band som är specifikt för HGH med en fragmentlängd på 434 bp framträder som intern kontroll.

Se även de speciella anmärkningarna på arbetsbladet för ABO-TYPE och ABO-TYPE-variant.



4.6.3. RH-TYPE

Den molekylärbio-logiska bestämningen av standard *RHD* såväl som av vissa *RHD*-varianter (*RHD*-positiva haplotyper i serologiskt D-negativa prover, partiell D, D_{ei}) och D Zygositet utförs i angivna PCR-reaktioner.



Preparat 1 och 2 är Multiplex-PCR reaktioner för att undersöka fem *RHD*-polymorfismer (*RHD* intron 4 och 7, exon 7, såväl som den specifika detekteringen av *RHD*01N.08* (W16X) och *RHD*08N.01* (Ψ)). Detta innebär att, i motsats till alla andra BAGene-kit (förutom det interna kontrollbandet), inte bara en utan även två specifika amplikoner kan förekomma i en PCR-reaktion. För att underlätta tolkningen delas respektive rutor upp när två möjliga band visas och har tvåfärgad bakgrund. Fragmentlängderna för PCR-produkten och polymorfismen identifieras också med en specifik färg enligt rutorna för reaktionsmönstret. Det rekommenderas att använda en DNA-längdstandard.

Exempel *RHD*08N.01* (Ψ):

Reaktion Nr. 1: Två specifika band måste visas i gelen.

- PCR produkt **224 bp - grå** identifiering, reaktionsmönster  i en ruta med **grå** bakgrund.
- PCR produkt **123 bp – blå** identifiering, reaktionsmönster  i en ruta med **blå** bakgrund.

Reaktion Nr. 2: Två specifika band måste visas i gelen.

- PCR produkt **154 bp** – **grön** identifiering, reaktionsmönster  i en ruta med **grön** bakgrund
- PCR produkt **390 bp** – **grå** identifiering, reaktionsmönster  i en ruta med **grå** bakgrund.

Angivna PCR-reaktioner är avsedda för den molekylärbiologiska bestämningen av egenskaperna hos *RHCE* gen locus. Ett band, som är specifikt för HGH, med en fragmentlängd på 434 bp, visas som intern kontroll. Ett undantag är PCR-reaktion nr. 2 där ett kontrollband visas vid 659 bp.

Om reaktionsmönstret indikerar en RHD-variant bör ytterligare undersökning med **Partial D-TYPE** utföras för att utesluta punktmutationer som orsak till dessa resultat.

D Zygosity

I RH-TYPE-kitet är det dessutom möjligt att typa status för RHD-Zygositet DD, Dd eller dd. Därför krävs närvaro eller frånvaro av Upstream *Rhesus-Box* (U_{BOX}) i reaktion nr. 10 och för *Rhesus Hybrid-Box* (H_{BOX}) i reaktion nr. 11.

För *RHD*-alleler, som inte kan bestämmas serologiskt (RhD-neg.), kan en diskrepans mellan det serologiska testresultatet och genotypning uppstå. Den positiva detektionen av Upstream *Rhesus Box* visar närvaron av en *RHD*-allel (*RHD*-pos.), förutom *RHD*08N.01* (Ψ) homozygot respektive hemizygot. Reaktionen av Mix 10 kan vara negativ även om en *RHD*-allel är närvarande.

Dessutom kan resultatet av Mix 10 med en genetiskt modifierad Upstream *Rhesus Box* (t.ex. för svag D 4.2 (DAR1)) också vara falskt negativ, även om provet är serologiskt D-positivt. För att kontrollera den typen av avvikelser innehåller RH-TYPE reaktioner för att detektera *RHD * 08N.01* (Ψ) och svag D 4,2 (DAR1). Således, med ett serologiskt D-positivt resultat och positiv PCR för Hybrid *Rhesus Box*, är resultatet "Dd." Det är "DD" när ett negativt PCR-resultat för Hybrid *Rhesus Box* uppstår. På grund av en distinkt polymorfism i Hybrid *Rhesus Box* hos afrikaner kan ett falskt positivt resultat inträffa i närvaro av *RHD*08N.01* (Ψ) och en annan *RHD*-allel.

Ytterligare D-antigen-negativa *RHD*-alleler kan inte uteslutas med för närvarande tillgängliga testkit. Detta måste beaktas vid tolkning av resultat. Förekomsten av dessa alleler i den vita befolkningen är dock ganska låg.

Degraderat DNA kan leda till falskt negativa resultat. Detta visas antingen genom närvaron av endast de interna kontrollbanden eller genom fullständig frånvaro av band.

4.6.4. Partial D-TYPE

Avsaknad av band i reaktion nr. 4 kan indikera DFR (serologi: svag positivt med anti-D) eller *RHD*08N.01* (Ψ) (hemi- eller homozygot D-negativt serologiskt). Om serologisk information saknas kan bekräftelse eller uteslutning av *RHD*08N.01* (Ψ) erhållas med RH-TYPE. I närvaro av *RHD *weak D* typ 41 (*RHD * 01W.41*) och *RHD*weak D* typ 45 (*RHD*01W.45*) avsaknad av reaktion i mix nr. 9 kan förekomma. Mutationer i intron sektioner kan också leda till avsaknad av reaktion i mix nr. 8 eller 9. I närvaro av *RHD*svag D* typ 20 (*RHD*01W.20*) visar reaktion nr. 10 vanligtvis inget band, men ibland uppträder ett svagt band.

En molekylärbiologisk differentiering av D-varianterna *RHD*DCS*, **DFW*, **DIM*, **DNU* från standard *RHD* är för närvarande inte möjlig. Hänsynen till haplotyperna är användbar.

5. Varningar och försiktighetsåtgärder

Etidiumbromid är en kraftfull mutagen. Undvik kontakt med hud och kontamineringar. Se bruksanvisning och tillverkarens varningar och försiktighetsåtgärder.

Transilluminator strålar ut mycket kortvågig UV-ljus som kan orsaka brännskador på huden och näthinnan. Använd en UV-ansiktsskyddsmask!

Biologiskt material som används för DNA-extraktion, t.ex. blod eller mänsklig vävnad, bör hanteras som potentiellt smittsamma. Vid hantering av biologiskt material rekommenderas lämpliga säkerhetsåtgärder (munpipettera inte, använd engångshandskar när du hanterar biologiskt material och utför testet; desinficera händerna när testet är klart). Biologiskt material bör inaktiveras före bortforsling (t.ex. med hjälp av en autoklav). Engångsartiklar ska autoklaveras eller förbrännas efter användning.

Spill av potentiellt infektiösa material bör omedelbart avlägsnas med absorberande pappersduk och de förorenade områdena torkas med lämpligt desinfektionsmedel eller 70% alkohol. Material som används för att rengöra spill, inklusive handskar, bör inaktiveras före avfallshantering (t.ex. med hjälp av en autoklav).

Kassering av alla prover, oanvända reagenser och avfall ska ske i enlighet med landets statliga och lokala föreskrifter.

Säkerhetsdatablad (MSDS) finns att ladda ner på www.bag-diagnostics.com.

6. Felsökning

Problem	Möjlig orsak	Åtgärd
Ingen amplifiering, längdstandard synlig	DNA kontaminerat med PCR-inhibitorer, DNA bryts ned	Upprepa DNA-isolering, testa olika metoder
	DNA-koncentration för hög/för låg	Ändra DNA-koncentration, upprepa DNA-isolering
	Enzym saknas eller enzymkoncentration för låg	Upprepa testet, Förändra enzymkoncentrationen
	DNA från hepariniserat blod	Upprepa testet med EDTA-blod
	Fel amplifieringsparametrar	Optimera amplifieringsparametrarna (se 4.3) ☆
Återkommande fel i enstaka fält (ingen amplifierings-kontroll)	Läckage i reaktionsrör, vattenförlust, och koncentrationsförändring under PCR	Förslut rören väl med lock
Ospecifik amplifiering, extra band (extra band av fel storlek måste försummas)	kontaminering med andra amplifieringsprodukter	sanering, upprepa testet, säkerställ rena arbetsförhållanden
	DNA förorenat med salter	Upprepa DNA isolering, testa olika metoder
	DNA koncentration är för hög	Använd mindre DNA
	Enzym koncentration är för hög	Använd mindre enzym
	Fel amplifieringsparametrar	Optimera amplifieringsparametrarna (se 4.3) ☆
Tolkningen visar mer än 2 specificiteter	Carry-over kontamination (amplifieringsprodukter!) ny allele	Kontrollera blandningarna utan att tillsätta DNA, sanering, säkerställa rena arbetsförhållanden
Inga eller bara mycket svaga band synliga, längdstandard osynlig	EtBr-färgning för svag	Upprepa färgning
För ljus gelbakgrund	EtBr-färgning för lång, EtBr-koncentrationen är för hög	Blötlägg gel i H ₂ O eller TBE, lägre EtBr-koncentration
Suddigt band	Elektroforesbuffert för varm eller förbrukad, fel elektroforesbuffert, polymerisering av gelen är inte fullständig	Sänk spänningen, använd 0,5x TBE-buffert, använd helt polymeriserad gel

☆ Vid användning av listad utrustning och material, bör optimering av amplifieringsparametrarna ses som en sista utväg. I de flesta fall är det möjligt att tolka resultat genom att eliminera extra band utifrån storleksvariation.






7. Referenser

1. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory

2. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166

För ytterligare referenser se www.bag-diagnostics.com.

8. Förklaring av förpackningssymboler

	Hållbar till
	Förvaringstemperatur / Nedre temperaturgräns
	Se bruksanvisning
	Tillräckligt för n tester
	Tillverkare
BLOOD TYPING	Avsett ändamål: Blodtypning
CONT	Innehåll, innehåller
HNA TYPING	Avsett ändamål: Bestämning av HNA-specificiteter
HPA TYPING	Avsett ändamål: Bestämning av HPA-specificiteter
BAGene INFORMATION CD	CD (innehåller bruksanvisning, arbetsblad, certifikat för kvalitetskontroll)
eIFU VXX/XXXX	Elektroniska bruksanvisningar Version av nuvarande bruksanvisning
IVD	För in vitro-diagnostik
LOT	Batch nummer
PCRBUF 10x	PCR buffert, 10x koncentrerad
PCRCAP	PCR lock
PCRPLATE	PCR plattor
PCRSTRIP	PCR strips
REACTIONMIX	Reaktionsblandningar
REF	Katalognummer
RTU	Bruksfärdig
TAQ POLYMERASE	Taq-Polymeras

För ytterligare information och bruksanvisningar på andra språk se vår webbsajt <http://www.bag-diagnostics.com> eller kontakta oss direkt på info@bag-diagnostics.com eller telefon: +49 (0)6404-925-125