



GEBRAUCHSINFORMATION

BAGene SSP Kits

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-diagnostics.com



Testkits zur Bestimmung der/des ABO-Blutgruppen, RH-Eigenschaften, Kell-, Kidd- und Duffy-Systeme, MNS-Systeme, seltene Blutgruppen-Systeme, HPA- und HNA-Merkmale auf molekulargenetischer Basis

gebrauchsfertig vorgetropft

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

Version: 16/2022 / Stand: 2022-03 Änderungen zu Version 15/2020 sind orange markiert.



INHALT

1.	PRODUKTBESCHREIBUNG	2
2.	MATERIAL	2
2.1.	Inhalt der BAGene-Kits.....	2
2.2.	Erforderliches bzw. zusätzliches Material	3
2.3.	Lagerung und Haltbarkeit.....	3
3.	LEISTUNGSDATEN	3
4.	TESTDURCHFÜHRUNG.....	4
4.1.	Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	4
4.2.	DNA-Isolierung.....	4
4.3.	Amplifikation.....	5
4.4.	Gelelektrophorese.....	7
4.5.	Dokumentation	8
4.6.	Auswertung der Ergebnisse und Einschränkungen der Methode.....	8
4.6.1.	Allgemein.....	8
4.6.2.	ABO-TYPE und ABO-TYPE variant.....	9
4.6.3.	RH-TYPE	9
4.6.4.	Partial D-TYPE.....	11
5.	WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE	11
6.	MÖGLICHE FEHLERQUELLEN.....	12
7.	LITERATUR	12
8.	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN	13

1. PRODUKTBESCHREIBUNG

Die BAGene-Kits sind In-vitro-Diagnostika zur Anwendung durch Fachpersonal. Sie werden für die molekulargenetische Typisierung von Blutgruppen-, Thrombozyten- und Granulozytenmerkmalen bei Spendern, Empfängern und Schwangeren eingesetzt. Die ABO-, ABO variant-, RH (mit D Zygosity)-, Partial D-, Weak D- und KKD-TYPE Kits dienen zur Ergänzung, Abklärung und Bestätigung serologischer Befunde. Für die Genotypisierung mit den MNS-, HPA-, HNA- und Rare-TYPE Kits ist ein serologischer Erstbefund nicht zwingend notwendig.

Ausgangsmaterial für die Typisierung mit BAGene-Kits ist gereinigte, leukozytäre DNA. Die Testdurchführung basiert auf der Sequence Specific Primer-(SSP)-PCR (siehe Abb. 1). Diese Methode nutzt die Tatsache, dass für eine erfolgreiche Reaktion beide Primer am 3'-Ende keine Fehlpaarungen aufweisen dürfen. Somit führt nur eine vollständige Übereinstimmung von Primer und Zielsequenz zu einem Amplifikat, welches durch eine anschließende Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird.

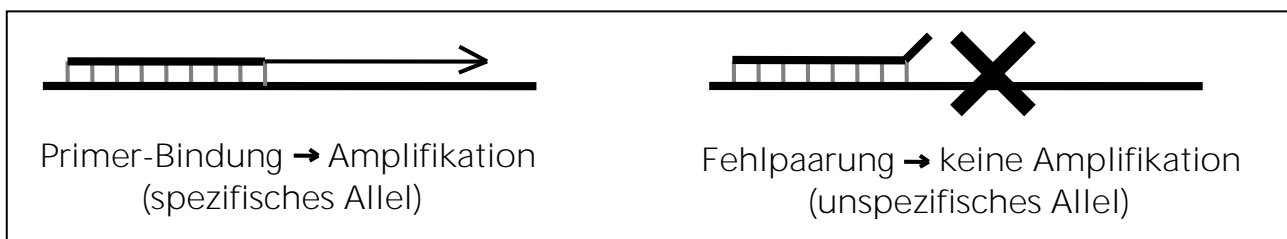


Abb. 1: Prinzip der SSP-PCR

Die Zusammensetzung der verschiedenen Primer-Mixe ermöglicht eine eindeutige Identifizierung der jeweils in den Worksheets angegebenen ABO-, RH-, KEL-, JK-, FY-, MNSs-, seltene Blutgruppen-, HPA- und HNA-Genotypen. Je Typisierung wird eine bestimmte Anzahl vorgetropfter Reaktionsansätze inkl. interner Amplifikationskontrolle eingesetzt.

2. MATERIAL

2.1. Inhalt der BAGene-Kits

- PCR-Platten/-Streifen für die molekulargenetische Blutgruppen-Typisierung. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze enthalten allelspezifische Primer, interne Kontroll-Primer (spezifisch für das HGH-Gen (**h**uman **g**rowth **h**ormone), bzw. eine genomischen Sequenz von Chromosom I (90 kbp 5' der *Rhesus Box*)) und Nukleotide. Der Reaktionsmix Nr. 1 ist markiert. Die Lot-Nummer ist auf jede/n Platte/Streifen gedruckt.
- 10x PCR-Puffer
- 8er-Streifen Deckel
- BAGene Informations-CD (enthält Gebrauchsinformation, Worksheet und Qualitätskontrollzertifikat)

2.2. Erforderliches bzw. zusätzliches Material

- Taq Polymerase (Happy Taq **REF** 66702 oder eine andere vom Anwender mit den BAGene Kits validierte Taq Polymerase).

Die Happy Taq wird bei der Bestellung eines BAGene Kits kostenlos mitgeliefert.

Bitte keine Hot-start Taq Polymerase verwenden (z.B. Ampli Taq Gold)!

- **EXTRA-GENE I** Kit (**REF** 7059) (optional) zur DNA-Extraktion aus Blut/Lymphozyten/Leukozyten oder Material für andere DNA-Extraktions-Methoden
- Kolbenhubpipetten (0,5 - 250 µl)
- Sterile Spitzen, ggf. mit Filter
- Thermocycler (Liste der validierten Thermocycler siehe Seite 7)
- Aqua dest
- DNA-Agarose
- 0,5x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)
- Ethidiumbromid (EtBr)
- Flachgelkammer mit Kämmen
- Spannungsgeber (200 - 300 V, 200 mA)
- DNA-Längenstandard
- UV-Leuchtplatte (Transilluminator, 220-310 nm)
- Geldokumentationssystem

2.3. Lagerung und Haltbarkeit

Die BAGene Kits werden ungekühlt versandt. Nach Erhalt müssen alle Kit-Reagenzien bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Happy Taq wird auf Trockeneis versandt und muss nach Erhalt bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Haltbarkeitsdauer ist auf den Etiketten der jeweiligen Reagenzien angegeben und gilt auch nach dem ersten Öffnen. Die auf dem Außenetikett angegebene Haltbarkeit entspricht dem Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit.

Den 10x PCR-Puffer und die PCR-Platten/-streifen direkt vor dem Ansatz der PCR auftauen. Die fertig angesetzten PCR-Platten/-streifen sofort in den Thermocycler stellen und den PCR-Lauf starten.

3. LEISTUNGSDATEN

Die Zusammensetzung der Primermixe gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung der auf dem Worksheet angegebenen Allele basierend auf den zur Zeit bekannten Sequenzdaten.

Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität der einzelnen Mixe wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekannter Spezifität überprüft. Nicht erfasste bzw. wegen ihrer Seltenheit nicht getestete Allele sind auf dem Worksheet kenntlich gemacht (n.t. = not tested currently).

Für alle BAGene-Produkte wurden Leistungsstudien mit vortypisierten DNA-Proben durchgeführt. Nicht erfasste bzw. wegen ihrer Seltenheit nicht getestete Allele sind auf dem Worksheet kenntlich gemacht. Die erzielten Typisierungen wurden mit den Resultaten der Vortypisierung, die mit anderen Blutgruppen-SSP-Kits, Nukleinsäuresequenzierungen oder serologischen Blutgruppen-Testmethoden erzielt wurden, verglichen. Die Typisierungen ergaben eine 100% Übereinstimmung zum Vortypisierungsergebnis.

Für die Validierung und Qualitätskontrollen der Mixe werden DNA Proben verwendet, die mit EXTRA GENE I (Aussalzungsmethode) oder Qiagen Kits (Säulenmethode) isoliert wurden. Bei Verwendung von anderen DNA-Extraktionskits muss vom Anwender validiert werden, ob die isolierte DNA für den Einsatz mit den BAGene Kits geeignet ist.

Die BAGene-Produkte sind mit der Happy Taq (REF 66702) validiert. Bei Verwendung einer anderen Taq-Polymerase muss diese vom Anwender für den Einsatz mit den BAGene Kits validiert werden.

Eine zuverlässige Typisierung ist bei einer Einsatzmenge von 50 – 100 ng DNA pro Reaktionsmix gewährleistet.

4. TESTDURCHFÜHRUNG

4.1. Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Bei der PCR handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode, die von geschultem, in Molekulartechnik und in der Blutgruppendiagnostik erfahrenem Personal durchgeführt werden muss. Aktuelle Richtlinien zur Transfusionsmedizin und Blutgruppenbestimmung sowie die Transfusionsanamnese sind zu beachten, um insbesondere bei diskrepanten Ergebnissen in serologischer und molekulargenetischer Testmethode, das Risiko von Fehlbestimmungen zu verringern. Die Genotypisierung der ABO-, RHD/RHCE-, Kell-, Kidd- und Duffy-Merkmale ist nach erfolgter serologischer Bestimmung durchzuführen.

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/-räume für die Prä-Amplifikation (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Amplifikation, Gel-Elektrophorese, Dokumentation)
- Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen

4.2. DNA-Isolierung

Das Probenmaterial für die Isolation der genomischen DNA sollte in geeigneten Abnahmesystemen verschickt werden. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen [2], derartige Abnahmesysteme sind daher nicht geeignet. Es wird der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen.

Validierte DNA Extraktionsmethoden:

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

Sowohl die manuelle Isolation als auch die automatisierte DNA Isolation (QIAcube) sind geeignet.

Bei Verwendung anderer Kits zeigte sich, dass die Elution mit Wasser (bidestilliertes Wasser, DNase freies Wasser) erfolgen sollte und nicht mit Elutionspuffern. Insbesondere bei Magnetic-Beads Isolationsmethoden wurde deutlich, dass die verwendeten Elutionspuffer die PCR-Reaktion inhibieren können und es somit zu schwach ausgeprägten Banden (schlechter Amplifikation) oder falsch-negativen Ergebnissen kommen kann. Daher wird empfohlen, die validierten Extraktionsmethoden zu verwenden.

Soll die bereits im Labor etablierte Standardmethode zur Isolation von gDNA verwendet werden, ist diese vom Anwender zu validieren.

Die DNA sollte folgende Reinheitsindices aufweisen:

- $OD_{260} / OD_{280} = >1,5$ und $<2,0$ (Indikator für Kontamination mit RNA / Proteinen)
- $OD_{260} / OD_{230} = >1,8$ (Indikator für Kontamination mit Salzen, Kohlenhydraten oder organischen Lösungsmitteln)

4.3. Amplifikation

Alle vorpipettierten Reaktionsmische beinhalten bereits die allelspezifischen Primer, Nukleotide sowie die Primer der internen Amplifikationskontrolle und liegen in getrockneter Form vor. Die Amplifikationsparameter sind auf ein Endvolumen von 10 μ l optimiert.

1. Die gewünschte Anzahl der PCR-Platten/-Streifen aus dem Gefrierschrank entnehmen und den 10x PCR-Puffer auftauen.
2. Den Master-Mix bestehend aus 10x PCR-Puffer, DNA-Lösung, Taq-Polymerase und Aqua dest. zusammenpipettieren und gründlich vortexen. Die verschiedenen BAGene-Kits werden mit dem gleichen Master-Mix angesetzt und sind daher miteinander kombinierbar.

Die Zusammensetzung des Mastermixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmische ist in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmixe

Anzahl Mixe	Aqua dest.	10x PCR-Puffer	DNA-Lsg. (50-100 ng/μl)	Taq Polymerase (5 U/μl)	Gesamt-volumen
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

⇒ Bei abweichenden DNA-Konzentrationen sind die Mengen von DNA-Lösung und Wasser entsprechend zu variieren (z.B. für 12 Mixe bei einer DNA-Konzentration von 120 ng/μl: 5,8 μl DNA-Lösung und 119 μl Aqua dest. einsetzen).

Wenn eine andere Taq-Polymerase verwendet werden soll, so muss diese vom Anwender mit den BAGene Kits validiert werden.

* Der Mastermixansatz für 6 Reaktionsmixe wird wegen des geringen Volumens Taq-Polymerase als Mindestansatz empfohlen.

3. Nach dem Vortexen werden von diesem Gemisch umgehend je **10 μl** zu den bereits in den Reaktionsgefäßen vorgelegten Reaktionsmixin pipettiert (siehe Abbildung). Nach jedem Pipettierschritt muss die Spitze gewechselt werden. Die Gefäße werden mit den dafür vorgesehenen Deckeln **dicht** verschlossen. Es ist darauf zu achten, dass die Deckelinnenseiten und die oberen Ränder nicht mit den Fingern berührt werden, um Verunreinigungen zu vermeiden. Bei Thermocyclern mit festdrehbarem Deckel können auch wieder-verwendbare PCR-Matten zum Verschließen verwendet werden. Durch leichtes Bewegen der Platte sollte das Pellet am Gefäßboden etwas angelöst werden, und es sollte darauf geachtet werden, dass sich die gesamte Reaktionslösung im Gefäßboden befindet.



4. Die Reaktionsgefäße in den Thermocycler stellen (auf festen Sitz achten!) und das PCR-Programm starten. Ein Überschichten der Ansätze mit Mineralöl ist bei Verwendung eines beheizten und justierbaren Deckels **nicht** nötig!

Amplifikationsprotokoll für alle BAGene-Kits

Programm-Schritt	Zeit	Temp.	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	5 Min	96°C	1 Zyklus
Denaturierung	10 Sek	96°C	5 Zyklen
Annealing+Extension	60 Sek	70°C	
Denaturierung	10 Sek	96°C	10 Zyklen
Annealing	50 Sek	65°C	
Extension	45 Sek	72°C	
Denaturierung	10 Sek	96°C	15 Zyklen
Annealing	50 Sek	61°C	
Extension	45 Sek	72°C	
Letzte Extension	5 Min	72°C	1 Zyklus

Validierte Thermocycler

- PTC 200 / C1000 (MJ Research/BioRad)
- GeneAmp PCR-System 9700 (bitte Heizrate von 9600 verwenden), Veriti (ABI)
- Mastercycler epGradient S (bitte die Funktion „simulate Mastercycler gradient“ verwenden) (Eppendorf)
- Tprofessional (Biometra)

Keine Aluminiumheizblöcke verwenden (z.B. GeneAmp PCR-System 9700)!

Bei Thermocyclern mit sehr schnellen Heiz- und Kühlraten wird empfohlen eine etwas langsamere Heiz- und Kühlrate (~ 2,5°C/sec) zu wählen.

Da Thermocycler verschiedener Hersteller sich in ihrem Verhalten unterscheiden und sogar verschiedene Thermocycler eines Typs unterschiedlich kalibriert sein können, muss bei Verwendung von anderen Thermocyclern ggf. das Amplifikationsprotokoll optimiert bzw. diese Geräte vom Anwender validiert werden.

Prinzipiell kann folgendermaßen vorgegangen werden:

Bei falsch positiven Reaktionen (unspezifische Banden, zusätzliche Typen):
Erhöhung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten.

Bei **falsch negativen** Reaktionen (fehlende Banden und/oder Amplifikationskontrollen):
Erniedrigung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten und/oder Erhöhung der Annealing-Zeiten in 5 Sekunden-Schritten und/oder Erhöhung der Denaturierungs-Zeiten in 5 Sekunden-Schritten.

Es wird empfohlen nur regelmäßig kalibrierte Thermocycler zu verwenden. Hierfür eignet sich gut der CYCLER CHECK (**REF** 7104, 71044).

4.4. Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Auswertung der Amplifikationsprodukte erfolgt durch Elektrophorese über ein Horizontal-Agarose-Gel. Als Laufpuffer wird 0,5x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) empfohlen. Die Gelstärke sollte 2,0 - 2,5% Agarose betragen. Vor dem Probenauftrag sollte das Gel mindestens 30 Minuten polymerisieren.

Nach Beendigung der Amplifikation werden die Proben dem Cycler entnommen. Die Streifendeckel sind vorsichtig zu öffnen. Anschließend werden die kompletten Ansätze vorsichtig in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Die Zugabe von Probenpuffer ist nicht mehr nötig. Zusätzlich sollte eine Tasche mit einem DNA-Längenstandard für den

Größenvergleich beladen werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 10 - 12 V/cm (bei 20 cm Elektroden-abstand ca. 200 - 240 V) für 20 - 40 Minuten. Nach abgeschlossenem Lauf wird das komplette Gel für 30 - 45 Minuten in einer Ethidiumbromid(EtBr)-Lösung (ca. 0,5 µg/ml EtBr in H₂O oder TBE-Puffer) gefärbt. Alternativ kann auch EtBr (0,5 µg/ml) dem Elektrophorese-Puffer oder Gel zugesetzt werden. Im Bedarfsfall kann das Gel für ca. 20 - 30 Minuten in H₂O entfärbt werden.

4.5. Dokumentation

Zur Dokumentation wird das Gel auf einen UV-Transilluminator (220-310 nm) gelegt und mit einem geeigneten Geldokumentationssystem fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, dass die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben (Näherungswerte: Blende 11, Belichtungszeit: 1 Sekunde).

Die Ergebnisse werden auf den dazugehörigen Worksheets dokumentiert (s. Punkt 4.6).

4.6. Auswertung der Ergebnisse und Einschränkungen der Methode

4.6.1. Allgemein

Die mit den BAGene-Kits erhaltenen Ergebnisse werden auf den dazugehörigen Worksheets dokumentiert. In den Worksheets sind die Merkmale, Spezifitäten, Phänotypen und Genotypen tabellarisch aufgelistet und als Interpretationshilfe sind Beispiele von Reaktionsmustern angegeben. Unter den Reaktionsnummern, mit denen jeder PCR-Ansatz versehen ist (z.B. ABO-TYPE mit den Reaktions-Nr. 1 - 8), ist die Fragmentlänge der spezifischen PCR-Produkte in bp angegeben. In den Zeilen darunter sind mögliche Bandenmuster im Gel dargestellt. Spezifische PCR-Produkte (positive Reaktion) sind mit **+** bezeichnet und die betreffenden Felder des Diagramms farblich unterlegt. ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, , KKD-TYPE, MNS-TYPE, Rare-TYPE, HPA-TYPE und HNA-TYPE sind **grau** unterlegt und RH-TYPE zusätzlich **rot, grün** und **blau**. Die Auswertung der Reaktionsmuster erfolgt in den Zeilen von links nach rechts.

Es werden nur solche Banden als positiv gewertet, die bezüglich eines DNA-Längenstandards die richtige Größe besitzen. Die korrekten Fragmentlängen der Amplifikate in bp sind dem Worksheet zu entnehmen. In allen Spuren ohne spezifische Amplifikation muss in jedem Fall die interne Kontrolle bei **434 bp** erscheinen. Eine Ausnahme bildet die **2. PCR-Reaktion von RH-TYPE**, hier ist die Fragmentlänge der internen Kontrolle **659 bp** lang. In den Ansätzen mit spezifisch positiver Reaktion fällt die interne Kontrolle meist schwächer aus oder kann, bedingt durch kompetitive PCR-Bedingungen, gänzlich verschwinden! Wenn weder eine spezifische Bande noch eine Kontrollbande auftritt, ist das Ergebnis mit dem betroffenen Mix nicht auswertbar.

Bei nicht auswertbaren Ergebnissen siehe Punkt 6 „Mögliche Fehlerquellen“.

Sollte mit den BAGene-Kits kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden (z.B. durch bis jetzt noch nicht bekannte Allele, die mit den vorhandenen Primern 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 unter-schiedlicher ethnischer Gruppen zu bewerten. Im Zweifelsfalle gilt der Phänotyp.

4.6.2. ABO-TYPE und ABO-TYPE variant

Die homozygote Ausprägung der Allele *ABO*O.01*, *ABO*O.02*, *ABO*B.01*, *ABO*A2.01* wird durch Banden in der dazu gehörenden PCR-Reaktion (1, 3, 5 oder 7) angezeigt. Bei Heterozygotie müssen außer zwei spezifischen PCR-Ansätzen (1, 3, 5, 7) zusätzlich auch alle vier „non-Reaktionen“ eine Bande im Gel zeigen (2, 4, 6 und 8). Homozygotie des Allels *ABO*A1.01* wird lediglich angezeigt durch Banden bei allen vier „non-Reaktionen“ (2, 4, 6, 8), da es keinen spezifischen Ansatz für *ABO*A1.01* gibt. Die heterozygote Merkmalskonstellation *ABO*A1.01* ist an einer zusätzlichen Bande der allelspezifischen Reaktionen (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 oder 16) zu erkennen.

Da mit ABO-TYPE variant nur eine Auswahl an varianten *A*-Allelen erfasst wird, können sich hinter dem PCR-Ergebnis *ABO*A1.01* andere variante *A*-Allele verbergen. Da mit ABO-TYPE variant nur eine Auswahl an varianten *B*-Allelen und keine varianten *A*²-Allele erfasst werden, können sich hinter dem PCR-Ergebnissen ***ABO*B.01*** und ***ABO*A2.01*** andere variante *B*-Allele bzw. variante *A*²-Allele verbergen. Die meisten *B*^(A) und *cis AB*-Allele zeigen in der *ABO*B.01*-Reaktion ebenfalls ein positives Ergebnis.

Als interne Kontrolle muss eine Bande, spezifisch für HGH, mit der Fragmentlänge von 434 bp erscheinen.

Bitte beachten Sie die speziellen Hinweise auf den Worksheets von ABO-TYPE und ABO-TYPE variant.



4.6.3. RH-TYPE

Die molekulargenetische Bestimmung des Standard-*RHD*, einiger *RHD*-Varianten (*RHD*-positive Haplotypen in serologisch D-negativen Proben, Partial-D, D_{el}) sowie der D Zygosity werden in den entsprechend gekennzeichneten PCR-Reaktionen durchgeführt.



Bei den Ansätzen 1 und 2 handelt es sich um Multiplex-PCR-Reaktionen zur Untersuchung von fünf *RHD*-Polymorphismen (*RHD* Intron 4 und 7, Exon 7 sowie spezifischer Nachweis von *RHD*01N.08* (W16X) und *RHD*08N.01* (Ψ)). Dies bedeutet, dass im Gegensatz zu allen anderen BAGene-Kits (außer der internen Kontrollbande) nicht nur ein, sondern auch zwei spezifische Amplifikate in einer PCR-Reaktion auftreten können. Zur Erleichterung der Auswertung sind die entsprechenden Felder bei zwei möglichen Banden unterteilt und mit zwei unterschiedlichen Farben unterlegt. Die Fragmentlängen der PCR-Produkte und die Polymorphismen sind passend zu den Reaktionsmusterfeldern ebenfalls farblich gekennzeichnet, es wird empfohlen DNA Längenstandard mitzuführen.

Beispiel *RHD*08N.01* (Ψ):

Reaktionen Nr. 1: Zwei spezifische Banden müssen im Gel erscheinen.

- PCR-Produkt **224 bp** – **grau** gekennzeichnet, Reaktionsmuster  in **grau** unterlegtem Feld
- PCR-Produkt **123 bp** – **blau** gekennzeichnet, Reaktionsmuster  in **blau** unterlegtem Feld.

Reaktionen Nr. 2: Zwei spezifische Banden müssen im Gel erscheinen.

- PCR-Produkt **154 bp** – **grün** gekennzeichnet, Reaktionsmuster  in **grün** unterlegtem Feld
- PCR-Produkt **390 bp** – **grau** gekennzeichnet, Reaktionsmuster  in **grau** unterlegtem Feld.

Für die molekulargenetische Bestimmung der Merkmale des *RHCE*-Genortes sind ebenfalls entsprechend gekennzeichnete PCR-Reaktionen vorgesehen. Als interne Kontrolle erscheint eine Bande, spezifisch für HGH, mit der Fragmentlänge von 434 bp.

Eine Ausnahme bildet PCR-Reaktion Nr. 2, hier erscheint eine Kontrollbande bei 659 bp.

Ergibt das Bandenmuster Hinweise auf einen RHD- Varianten, so sollte eine Abklärung dieses Befundes mit **Partial D-TYPE** durchgeführt werden, um Punktmutationen als Ursache dieser Befunde auszuschließen.

D Zygotie

Im RH-TYPE kann zusätzlich der RHD-Zygotie Status DD, Dd oder dd bestimmt werden. Hierfür wird in Reaktionen Nr. 10 nach der An- bzw. Abwesenheit der Upstream *Rhesus-Box* (U_{BOX}) und in Reaktionen Nr. 11 die der Rhesus *Hybrid-Box* (H_{BOX}) gefragt.

Bei *RHD*-Allelen, die serologisch nicht nachweisbar sind (RhD neg.), kann es zur Diskrepanz zwischen serologischem Testergebnis und Genotypisierung kommen.

Der positive Nachweis der Upstream *Rhesus-Box* zeigt das Vorhandensein eines *RHD*-Allels (*RHD* pos.), mit Ausnahme des Allels *RHD*08N.01* (Ψ) in homo-, bzw.hemizygoter Form. Hier kann Mix 10 negativ ausfallen, obwohl ein RHD-Allel vorhanden ist.

Weiterhin kann bei genetisch veränderter Upstream *Rhesus-Box* (z.B. bei weak D 4.2 (DAR1)) Mix 10 keine positive Reaktion zeigen, obwohl die Probe serologisch D-positiv ist. Zur Überprüfung solcher Diskrepanzen sind im RH-TYPE die Reaktionen zum Nachweis von *RHD*08N.01* (Ψ) sowie weak D 4.2 (DAR1) implementiert. Bei serologisch D-positivem Ergebnis und positiver PCR für die Hybrid *Rhesus-Box* lautet daher der Befund „Dd“ und bei negativer PCR für die Hybrid *Rhesus-Box* „DD“.

Bei Proben aus afrikanischen Bevölkerungsgruppen kann es, bedingt durch den ausgeprägten Polymorphismus in der Hybrid *Rhesus-Box*, zu einem falsch positiven Ergebnis bei Vorhandensein von *RHD*08N.01* (Ψ) und einem weiteren *RHD*-Allel kommen. Weitere Antigen-D negative *RHD*-Allele können mit den vorhandenen

Testkits derzeit nicht ausgeschlossen werden. Dies ist bei der Befundinterpretation zu berücksichtigen. Diese Allele treten in der Weißen Bevölkerung recht selten auf.

Degradierete DNA kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Hier ist entweder nur die Bande der internen Kontrolle zu sehen, oder es ist keine Bande erkennbar.

4.6.4. Partial D-TYPE

Der Ausfall der Bande in der Reaktion Nr. 4 weist auf das Vorhandensein von DFR (serologisch schwach D-positiv) oder *RHD*08N.01* (Ψ) (hemi- bzw. homozygot, serologisch D- negativ) hin. Bei fehlender Information zur Serologie kann *RHD*08N.01* (Ψ) mit BAGene RH-TYPE bestätigt oder ausgeschlossen werden. In Gegenwart von RHD*weak D type 41 (RHD*01W.41) und RHD*weak D type 45 (RHD*01W.45) kann es zum Ausfall von Reaktion Nr. 9 kommen. Mutationen im Intron-Bereich können ebenfalls zum Ausfall von Mix Nr. 8 oder 9 führen. Bei RHD*weak D type 20 (RHD*01W.20) tritt in Reaktion Nr. 10 normalerweise keine Bande auf, aber manchmal kann eine schwache Bande erscheinen.

Eine molekulargenetische Differenzierung der D-Varianten *RHD*DCS*, **DFW*, **DIM*, **DNU* zum Standard-*RHD* ist zur Zeit nicht möglich. Die Berücksichtigung der Haplotypen zur Unterscheidung dieser Varianten ist hilfreich.

5. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE

Ethidiumbromid ist ein stark mutagenes Reagenz. Hautkontakt und Kontaminationen sind zu vermeiden! Die Gebrauchsinformation sowie die Warn- und Entsorgungshinweise des entsprechenden Herstellers sind zu beachten!

Der Transilluminator sendet sehr kurzwelliges UV-Licht aus, das Verbrennungen der Haut und der Netzhaut hervorrufen kann. UV-Gesichtsschutz tragen!

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 (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen 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).

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Eine Erklärung zum Sicherheitsdatenblatt (SDS) kann unter www.bag-diagnostics.com heruntergeladen werden.

6. MÖGLICHE FEHLERQUELLEN

Fehler	Mögliche Ursache	Beseitigung
Keine Amplifikation, Längenstandard sichtbar	DNA verunreinigt, DNA degradiert, PCR-Inhibitoren	DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode
	DNA-Konzentration zu hoch / zu niedrig	DNA-Konzentration ändern, DNA-Isolierung wiederholen
	Enzym fehlt oder Konzentration zu niedrig	Typisierung wiederholen, Enzym-Konzentration ändern
	DNA aus Heparin-Blut	Typisierung mit EDTA-Blut wiederholen
	Falsche Amplifikationsparameter	Optimierung der Parameter (siehe 4.3)*
Wiederholte Ausfälle (keine Kontrollbande) in einzelnen Spuren	Deckel der Reaktionsgefäße schließen nicht dicht; dadurch Wasserverlust und Konzentra- tionsänderung während der PCR	Deckel fest verschließen
Unspezifische Amplifikation, Zusatzbanden (zusätzliche Banden falscher Größe sind zu vernachlässigen)	Kontamination mit Amplifikaten	Typisierung wiederholen; auf sauberes Arbeiten achten, Dekontamination
	DNA mit Salzen verunreinigt	DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode
	DNA-Konzentration zu hoch	Weniger DNA einsetzen
	Enzym-Konzentration zu hoch	Weniger Enzym einsetzen
	Falsche Amplifikationsparameter	Optimierung der Parameter (siehe 4.3)*
Auswertung ergibt mehr als 2 Spezifitäten	Kontamination mit Fremd-DNA (Amplikat!) Neues Allel	Reaktionsmixe testen (ohne Zugabe von DNA); auf sauberes Arbeiten achten; Dekontamination
Keine oder sehr schwache Banden sichtbar, Längenstandard kaum sichtbar	EtBr-Färbung zu schwach	Färbung wiederholen
Gel-Hintergrund leuchtet zu stark	Färbung zu lange, EtBr-Konzentration zu hoch	Mit H ₂ O entfärben, EtBr niedriger konzentrieren
Verschmierte Banden im Gel	Laufpuffer zu heiß oder verbraucht, falscher Laufpuffer, Gel nicht auspolymerisiert	Geringere Voltzahl wählen, 0,5x TBE-Puffer verwenden, nur vollständig poly- merisierte Gele verwenden






* Bei Verwendung der angegebenen Geräte und Materialien ist eine Optimierung der Amplifikationsparameter als letztes Hilfsmittel einzusetzen. In den meisten Fällen ist eine Auswertung durch die Eliminierung der Zusatzbanden aufgrund der Größenabweichung möglich.

7. LITERATUR

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

Weitere Literaturhinweise finden Sie auf unserer Website www.bag-diagnostics.com.

8. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN

	Verwendbar bis
	Lagertemperatur / Oberer Temperaturgrenzwert
	Gebrauchsinformation beachten
	Ausreichend für n Tests
	Hersteller
BLOOD TYPING	Zweckbestimmung: Blutgruppenbestimmung
CONT	Inhalt, enthält
HNA TYPING	Zweckbestimmung: Bestimmung der HNA-Merkmale
HPA TYPING	Zweckbestimmung: Bestimmung der HPA-Merkmale
BAGene INFORMATION CD	CD (enthält Gebrauchsinformationen, Worksheet, Qualitätskontrollzertifikat)
eIFU VXX/XXXX	Elektronische Gebrauchsinformation Version der aktuellen Gebrauchsinformation
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Lot-Nummer
PCRBUF 10x	PCR-Puffer, 10x konzentriert
PCRCAP	PCR-Deckel
PCRPLATE	PCR-Platten
PCRSTRIP	PCR-Streifen
REACTIONMIX	Reaktionsmische
REF	Bestell-Nummer
RTU	gebrauchsfertig
TAQ POLYMERASE	Taq-Polymerase

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website www.bag-diagnostics.com oder kontaktieren Sie uns direkt über info@bag-diagnostics.com.