

IT

Istruzioni d'uso

BAGene DNA-SSP Kits

Kit per la determinazione dei **gruppi del sangue ABO, genotipi RH, sistemi Kell, Kidd e Duffy, MNS, sistemi gruppoematici rari e specificità HPA ed HNA** in biologia molecolare



pronti all'uso e prealiquotati

- REF 6640: ABO-TYPE**
- REF 6641: ABO-TYPE variant**
- REF 6645: RH-TYPE**
- REF 6646: Partial D-TYPE**
- REF 6647: Weak D-TYPE**
- REF 6648: D Zygoty TYPE**
- REF 6650: KKD-TYPE**
- REF 6652: MNS-TYPE**
- REF 6653: Rare-TYPE**
- REF 6660: HPA-TYPE**
- REF 66701: HNA-TYPE**

Indice

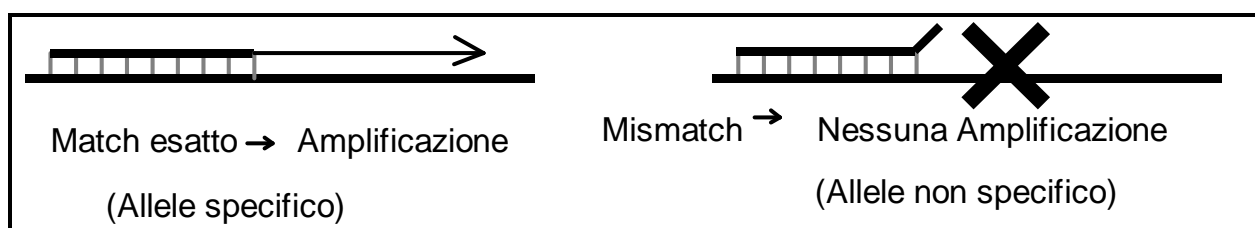
1. Descrizione del prodotto	2
2. Materiale	2
2.1 Contenuto dei BAGene DNA-SSP kits	2
2.2 Materiale necessario e supplementare	2
2.3 Conservazione e stabilità	3
3. Dati per l'esecuzione.....	3
4. Procedura del test.....	3
4.1 Condizioni di sicurezza ed indicazioni speciali	3
4.2 Estrazione del DNA.....	3
4.3 Amplificazione.....	4
4.4 Gel elettroforesi	5
4.5 Documentazione ed interpretazione.....	6
4.6 Spiegazione dei fogli di lavoro e del diagramma d'interpretazione	6
4.6.1 Generalità	6
4.6.2 ABO-TYPE e ABO-TYPE variant	6
4.6.3 RH-TYPE	7
4.6.4 Partial D-TYPE	7
4.6.5 RH-TYPE	7
5. Avvertenze e precauzioni	8
6. Soluzione dei problemi.....	9
7. Riferimenti	9
8. Spiegazione dei simboli	10

1. Descrizione del prodotto

I kit BAGene sono utilizzati per la determinare le specificità dei gruppi sanguigni di donatori, riceventi, gravide con un'analisi a livello di DNA. I kit ABO-, ABO variant-, RH-, Partial D-, Weak D-, D Zigosità e KKD-TYPE sono utili per completare, chiarire e confermare i risultati ottenuti in serologia. I kit MNS-, HPA-, HNA- e Rare-TYPE possono essere impiegati per una tipizzazione molecolare senza test serologici aggiuntivi, a meno che altrimenti richiesto (si consultino le regolamentazioni nazionali specifiche).

Il materiale base per la tipizzazione con i kit BAGene è il DNA leucocitario purificato. La procedura del test prevede l'uso del metodo *Sequence Specific Primer (SSP)-PCR*^① (vedi Fig. 1). Questo metodo si basa sul fatto che l'estensione del primer, e perciò la riuscita della amplificazione da PCR, dipende da un esatto match di entrambi i primer all'estremità 3'. Quindi, l'amplificazione avviene solo se i primer sono complementari alla sequenza target, e l'amplificato (esistente se la reazione è positiva) viene di seguito evidenziato dall'elettroforesi su gel d'agarosio.

Fig. 1: Principio dell'SSP-PCR



L'insieme delle reazioni ottenute o meno dalle diverse miscele di primer rende possibile una chiara identificazione dei genotipi ABO, RH, KEL, JK, FY, MNS, gruppi ematici rari, HPA ed HNA mediante i rispettivi diagrammi d'interpretazione. Per ogni tipizzazione viene usato un certo numero di mix di reazione prealiquotate. In ogni miscela di reazione è incluso un controllo di amplificazione interno.

2. Materiale

2.1 Contenuto dei BAGene / DNA-SSP Kit

- ◆ Piastre/strisce per tipizzazione di gruppi sanguigni. Le mix di reazione prealiquotate e liofilizzate includono i primer allele-specifici, i primer del controllo interno (specifici per il gene HGH - human growth hormone – o per una sequenza del cromosoma I – 90 kbp 5' della *Rhesus Box*) e i nucleotidi. La prima mix di reazione è contrassegnata e viene indicato il numero di lotto su ogni piastra/striscia.
- ◆ PCR-buffer 10 x
- ◆ strisce di tappi da 8
- ◆ Informazioni per la valutazione (solo per ABO-TYPE variant)

2.2 Materiale necessario e non incluso

- ◆ Happy Taq (REF: 70976) (o un'altra Taq polimerasi, validata coi kit BAGene dall'operatore). La Happy Taq è fornita gratuitamente insieme ai kit BAGene.
Non utilizzare una Taq Polimerasi hot start (tipo Ampli Taq Gold)
- ◆ EXTRA-GENE Kit (REF: 7059) (facoltativo) per l'estrazione del DNA da sangue / linfociti / leucociti o altro materiale per altri metodi di estrazione di DNA
- ◆ Pipette (0,5-250 µl)
- ◆ Punte sterili con filtro
- ◆ Termociclatore (per la lista di termociclatori validati, si veda a pag. 5)
- ◆ Agarosio
- ◆ TBE buffer 0.5 x (45 mM di Tris, 45 mM di acido bórico, 0,5 mM di EDTA)
- ◆ Etidibromuro (EtBr)
- ◆ Cella elettroforetica submarine
- ◆ Alimentatore (200-300 V, 200 mA)
- ◆ Standard di peso molecolare (REF: 7097)
- ◆ Transilluminatore (220-310 nm)
- ◆ Sistema di fotodocumentazione per gel

2.3 Conservazione e stabilità

I kit BAGene sono spediti a temperatura ambiente. La Happy Taq viene spedita in ghiaccio secco. Dopo la spedizione, conservare tutti i reagenti a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. La data di scadenza è indicata sull'etichetta di ogni reagente ed è valida anche per i reagenti già aperti. La data di scadenza indicata sull'etichetta esterna si riferisce al reagente contenuto nel kit con la stabilità più breve. Scongellare brevemente il PCR-buffer 10 x prima dell'uso.

3. Dati per l'esecuzione

La composizione delle mix dei primer garantisce un'identificazione attendibile degli alleli indicati nei fogli di lavoro sulla base dei dati di sequenza attualmente conosciuti.

L'accuratezza e la specificità di ogni mix di primer è stata testata con DNA di campioni di riferimento a specificità nota. Gli alleli non disponibili, che per la loro rarità non sono stati testati, sono indicati nel foglio di lavoro con *n.t. (non attualmente testati)*.

Per tutti i kit BAGene è stato eseguito uno studio della performance con campioni di riferimento pretipizzati. Alcune mix di reazione non hanno potuto essere testate come positive in quanto specifiche per alleli rari non disponibili per i test. Ciò è indicato sul diagramma di valutazione o la tabella di specificità.

Le ricerche hanno mostrato risultati chiari in relazione alle pretipizzazioni sierologiche e/o genomiche. Non sono state riscontrate discrepanze durante tali studi.

La valutazione e il controllo di qualità delle mix sono state condotte con DNA campioni estratti con EXTRA GENE I (metodo salting out) o con kit Qiagen (metodo su colonna).

I kit BAGene sono validati con Happy Taq (REF 70976). L'utilizzo di altre Taq polimerasi dev'essere validato per i BAGene kit da parte dell'operatore.

Viene garantita una tipizzazione attendibile usando 50 - 100 ng di DNA per ciascuna mix di reazione, ad eccezione del D-Zygotity-TYPE. A causa del programma di PCR più lungo, si raccomanda di partire per questo prodotto da una concentrazione di DNA inferiore (30-50 ng).

4. Procedura del test

4.1 Condizioni di sicurezza ed indicazioni speciali

La PCR è un metodo molto sensibile che dovrebbe essere eseguito da personale debitamente addestrato con esperienza in tecniche di biologia molecolare e sierologia dei gruppi del sangue. Dovrebbero essere seguite le linee guida della medicina trasfusionale e della determinazione dei gruppi del sangue così come quelle dell'anamnesi trasfusionale per evitare rischi di false tipizzazioni, in particolar modo in caso di discrepanze nei risultati tra metodo sierologico e quello in biologia molecolare. La genotipizzazione delle specificità ABO, RHD/RHCE, Kell, Kidd e Duffy va eseguita dopo la determinazione sierologica.

Si devono osservare condizioni speciali di sicurezza per evitare contaminazioni e perciò false reazioni:

- ◆ Indossare i guanti durante il lavoro (se possibile senza talco).
- ◆ Usare un nuovo puntale con filtro per ogni passaggio di pipettaggio.
- ◆ Usare aree di lavoro separate per la pre-amplificazione (estrazione del DNA e preparazione delle reazioni) e post-amplificazione (elettroforesi del gel, documentazione); usare preferibilmente due stanze separate.
- ◆ Usare strumenti ed altro materiale solo nelle rispettive aree e non scambiarli.

4.2 Estrazione del DNA

Il kit **EXTRA-GENE I** è adeguato per l'estrazione poiché si ottiene del DNA puro da sangue intero in breve tempo senza l'uso di reagenti chimici tossici e solventi. Inoltre, altri metodi commerciali basati su colonna o su biglie o descritti in letteratura sono idonei per fornire una sufficiente purezza del DNA. L'eparina potenzialmente inibisce la PCR. Perciò per la tipizzazione si consiglia sangue in EDTA o in citrato.

Il DNA dovrebbe mostrare i seguenti indici di purezza:

- $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = > 1.5$ e < 2.0 (indicatore di contaminazione da RNA/proteine)
- $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} = > 1.8$ (indicatore di contaminazione con sali, carboidrati o solventi organici)

4.3 Amplificazione

Tutte le mix di reazione prealiquotate contengono i primer allele-specifici, primer di controllo interno e i nucleotidi. Queste sono fornite liofilizzate adesi nel fondo delle provette di reazione. I parametri di amplificazione sono ottimizzati per un volume finale di 10 µl.

1. Prelevare il numero richiesto di piastre/strip dal congelatore e scongelare il PCR-buffer 10 x.
2. Preparare la Master-Mix costituita da PCR-buffer 10x, soluzione di DNA, Taq-Polymerase e acqua distillata e miscelare bene. I differenti kit BAGene funzionano tutti con la stessa Master-Mix e perciò possono essere combinati, ad eccezione del D Zygosity-TYPE per il quale è raccomandata una diversa concentrazione di DNA. La composizione della Master-Mix è indicata nella Tabella 1.

Tabella 1: Composizione della Master-Mix in funzione del numero di mix di reazione

n°di mix	Soluzione DNA (50-100 ng/µl)♦	Acqua dist.	PCR-buffer 10x	Happy Taq (5 U/µl)	Volume totale	
1	1	8	1	0,08	10	µl
2	2	16	2	0,2	20	µl
6☆	7	50	7	0,5	65	µl
7	9	70	9	0,7	90	µl
8	10	80	10	0,8	100	µl
9	11	88	11	0,9	110	µl
10	12	96	12	1,0	120	µl
11	13	104	13	1,0	130	µl
12	14	112	14	1,1	140	µl
13	16	128	16	1,3	160	µl
14	17	136	17	1,4	170	µl
15	18	144	18	1,4	180	µl
16	19	152	19	1,5	190	µl

⇒ per concentrazioni di DNA diverse, le quantità di DNA e di acqua devono variare in proporzione (per es. per 12 mix: DNA (120 ng/µl): usare 5,8 µl di DNA e 119 µl di Acqua dist.).

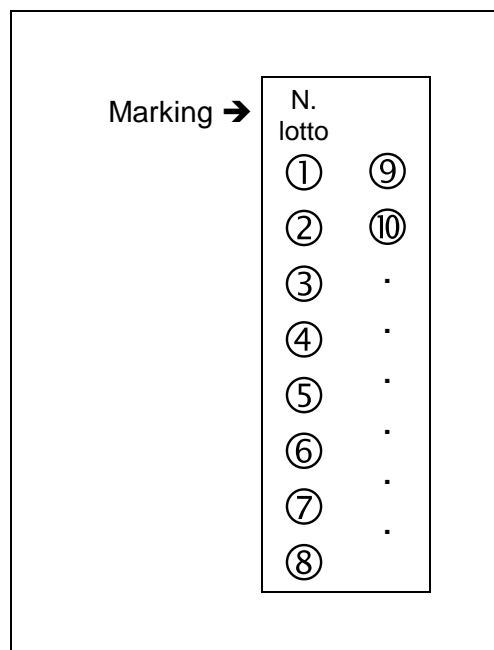
Se viene utilizzato un altro tipo di Taq Polimerasi l'enzima dev'essere validato coi BAGene da parte dell'operatore.

☆ si consiglia una preparazione minima di mastermix per 6 mix di reazione, per il basso volume di Taq-Polymerase.

♦ per il kit D Zygosity-TYPE si consiglia una concentrazione di DNA di 30 – 50 ng/µl

3. Dopo aver vortexato la mastermix dispensare **10 µl** di questa miscela nelle provette di reazione preseminate. Cambiare il puntale dopo ogni semina. Chiudere bene le provette con i rispettivi tappi. Assicurarsi di non toccare con le dita la parte interna dei tappi ed il bordo superiore delle provette per evitare contaminazione. Se si usa un termociclatore con coperchio a chiusura ermetica, è anche possibile usare PCR mats riciclabili. Scuotere leggermente la piastra per dissolvere il pellet blu sul fondo della provetta. Tutte le miscele di reazione PCR devono depositarsi sul fondo.

- 4.: Mettere le provette di reazione nel termociclatore e chiudere il coperchio in modo che le provette non si deformino riscaldandosi. Avviare il programma di PCR^①. Se si utilizza un coperchio termostato **non** è



necessario aggiungere olio minerale nelle provette!

Parametri di amplificazione per tutti i kit BAGene ad eccezione del D Zygoty-TYPE

Programma	Tempo	Temp.	Numero di cicli
Prima denaturazione	5 Min	96°C	1 ciclo
Denaturazione	10 Sec	96°C	5 cicli
Annealing+Estensione	60 Sec	70°C	
Denaturazione	10 Sec	96°C	10 cicli
Annealing	50 Sec	65°C	
Estensione	45 Sec	72°C	
Denaturazione	10 Sec	96°C	15 cicli
Annealing	50 Sec	61°C	
Estensione	45 Sec	72°C	
Estensione finale	5 Min	72°C	1 ciclo

Termociclatori validati:
PTC 100 / 200 / C1000 (MJ Research/ Bio-Rad)

GeneAmp PCR- System 9700 (utilizzare in modalità 9600) , Veriti (ABI)

Mastercycler epGradient S (utilizzare la funzione "simulate Mastercycler gradient")

(Eppendorf)
T professional (Biometra)

ATTENZIONE: Programma di PCR diverso !

Parametri di amplificazione D Zygoty-TYPE

Programma	Tempo	Temp.	Numero di cicli
Prima denaturazione	10 Min	95°C	1 ciclo
Denaturazione	20 Sec	92°C	35 cicli
Annealing	30 Sec	64°C	
Estensione	5 Min	68°C	
Estensione finale	5 Min	72°C	1 ciclo

Termociclatori validati:
Si vedano i parametri di amplificazione per tutti i kit BAGene.

Si prega di non utilizzare un blocco scaldante in alluminio (ad es. con GeneAmp PCR-System 9700)!

Quando si impiegano termociclatori con velocità di riscaldamento e raffreddamento molto elevata, si raccomanda di utilizzare una velocità inferiore (~2.5 °C/sec).

Poichè i termociclatori di produttori diversi hanno performance diverse ed anche i singoli apparecchi dello stesso tipo potrebbero essere calibrati in modo diverso, potrebbe essere necessario ottimizzare i parametri di amplificazione o validare il nuovo tipo di termociclatore da parte dell'utilizzatore.

Per ottimizzare il Vs. apparecchio seguire le seguenti linee guida:

Con reazioni **false positive** (bande non specifiche aggiuntive): aumentare la temperatura di annealing di 1° C in ogni fase.

Con reazioni **false negative** (bande assenti): diminuire la temperatura di annealing di 1° C in ogni fase e/o aumentare i tempi di annealing di 5 secondi in ogni fase e/o aumentare i tempi di denaturazione di 5 secondi in ogni fase.

Si raccomanda di usare solo termociclatori regolarmente calibrati. Per questa procedura di calibrazione è ideale kit CYCLER CHECK (REF: 7104, 71044).

4.4 Gel elettroforesi

La separazione dei prodotti di amplificazione si esegue tramite elettroforesi in gel di agarosio orizzontale. Si consiglia come tampone per l'elettroforesi TBE 0.5x (45 mM di tris, 45 mM di acido borico, 0.5 mM di EDTA). La concentrazione del gel dovrebbe essere 2.0 – 2.5% di agarosio. Lasciare polimerizzare il gel per almeno 30 minuti prima di caricare il campione. Al termine dell'amplificazione, prelevare i campioni dal termociclatore e caricare con attenzione ciascuna miscela di reazione in ogni pozzetto del gel. Inoltre, caricare 10 µl di DNA length standard per la

valutazione del peso molecolare. L'elettroforesi è eseguita a 10-12 V/cm (per es. con elettrodi distanti 20 cm impostare 200-240V), per 20-40 minuti. Per migliorare la separazione delle bande che si ottengono con il kit **D-Zygoty-TYPE** è preferibile una corsa della durata di 40 minuti. Al termine della corsa, il gel viene immerso in una soluzione di etidibromuro (EtBr) (circa 0.5 µg/ml di EtBr in H₂O o buffer TBE). In alternativa, l'EtBr (0.5 µg/ml) può essere aggiunto al buffer per l'elettroforesi o al gel di agarosio. Se necessario rimuovere l'EtBr in eccesso immergendo il gel in H₂O per 20-30 minuti.

4.5 Documentazione

Per la documentazione, visualizzare il prodotto di PCR usando un transilluminatore UV (220-310 nm) e fotografare con un adeguato sistema di documentazione gel. Scegliere i tempi di esposizione e di apertura in modo che le bande siano bene visibili e risaltino sul sfondo scuro (per es. apertura 11, tempo d'esposizione 1 sec). I risultati sono documentati e forniti con il foglio di lavoro (si veda il paragrafo 4.6).

4.6 Interpretazione dei risultati e limitazioni del metodo

4.6.1 Generalità

I risultati delle determinazioni molecolari eseguiti tramite i kit BAGene sono documentati nei fogli di lavoro forniti. Nei fogli di lavoro è contenuto un elenco delle caratteristiche, le specificità, il fenotipo, il genotipo e un esempio di pattern di reazione allo scopo di fornire un aiuto nell'interpretazione. Le mix di reazioni sono indicate con un numero (per es. ABO-TYPE reazione n. 1 - 8). La lunghezza del prodotto di PCR (bande specifiche) è espresso in bp sotto il numero di ciascuna reazione. Nelle righe sotto sono indicate possibili combinazioni di reazione come risultano nel gel. I prodotti di PCR specifici (reazioni positive) sono contrassegnati con + ed i corrispondenti riquadri del diagramma sono colorati. ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, KKD-TYPE, D Zygoty-TYPE, MNS-TYPE, Rare-TYPE, HPA-TYPE, HNA-TYPE sono colorati in **grigio**, RH-TYPE anche in **rosso, verde e blu**.

L'interpretazione è da leggersi da sinistra verso destra.

Per l'interpretazione sono da considerare positive sole le bande che hanno un peso molecolare corretto in confronto al DNA length standard. Le dimensioni corrette sono indicate nel foglio di lavoro. In ogni reazione senza amplificazione allele-specifica il controllo interno deve risultare di **434 bp** (eccetto il **D Zygoty-TYPE** e la 2° reazione di **RH-TYPE**: dove il frammento del controllo interno è di **659 bp**). Nelle reazioni con una positività allele-specifica il controllo interno è generalmente più debole, o assente. Per risultati anomali vedere la "Soluzione dei problemi" (paragrafo 6).

Se non si possono ottenere risultati chiari con i kit BAGene (ad esempio a causa di alleli sconosciuti non rilevabili dai primer esistenti), è necessario seguire le linee guida nazionali per la medicina trasfusionale in accordo con le tipizzazioni serologiche. Si raccomanda analisi di sequenziamento per questi campioni. I risultati di tipizzazione dovrebbero essere interpretati tenendo in considerazione la variazione genetica nei diversi gruppi etnici. In caso di dubbio, è valido il fenotipo.

4.6.2 ABO-TYPE e ABO-TYPE variant

L'espressione in omozigosi degli alleli *ABO*O01*, *ABO*O03*, *ABO*B101*, *ABO*A201* è indicata dalle corrispondenti bande di reazione specifiche (1, 3, 5, o 7). In caso di eterozigosi tutte le quattro „non-reazioni“ devono essere positive (2, 4, 6, 8) insieme a due reazioni specifiche (1, 3, 5, 7). L'omozigosi dell'allele *ABO*A101* è indicata solo dalle bande nelle quattro „non-reazioni“ (2, 4, 6, 8), poiché non c'è una reazione specifica per l' *ABO*A101*. L'eterozigosi con l'allele *ABO*A101* può essere riconosciuta dalla presenza di una banda addizionale delle reazioni allele-specifiche (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16).

Poiché ABO-TYPE variant è in grado di rilevare solo una selezione delle possibili varianti degli alleli *A*, altre varianti potrebbero essere nascoste dietro ai risultati di PCR per ***ABO*A101***. Poiché ABO-TYPE variant è in grado di rilevare solo una selezione delle possibili varianti degli alleli *B* e nessuna delle varianti *A*², altre varianti *B* e *A*² potrebbero essere nascoste dietro ai risultati di

ABO*B101 e **ABO*A201**, rispettivamente. La maggioranza degli alleli $B^{(A)}$ e *cis* AB mostra anch'essa un risultato positivo nella reazione ABO*B101.

Una banda specifica per HGH con un frammento lungo 434 bp è un controllo interno.

Le spiegazioni dettagliate sono descritte in istruzioni extra per l'interpretazione di ABO-TYPE variant, incluse in ogni kit. Consultare anche le osservazioni speciali sul foglio di lettura di ABO-TYPE ed ABO-TYPE variant.



4.6.3 RH-TYPE

La determinazione molecolare del' *RHD* standard così come quella di alcuni *RHD*-varianti (aplotipi *RHD*-positivi in campioni D-negativi sierologici, partial D) si esegue nelle reazioni di PCR specifiche.



Le reazioni 1 e 2 sono delle Multiplex-PCR per esaminare cinque polimorfismi *RHD* (*RHD* introne 4 e 7, esone 7, così come la determinazione specifica del' *RHD* (W16X) e *RHD*Ψ). Questo significa, che a differenza di tutti gli altri kit BAGene (eccetto che per la banda del controllo interno) in una reazione di PCR possono visualizzarsi non solo uno, ma anche due ampliconi specifici. Per agevolare l'interpretazione, i rispettivi riquadri sono divisi quando appaiono due possibili bande ed hanno uno sfondo di due colori diversi. Le lunghezze dei prodotti di PCR ed i polimorfismi sono identificati con lo stesso colore specifico in relazione ai riquadri.

Esempio *RHD*Ψ:

Reazione N. 1: Devono apparire due bande specifiche nel gel.

- prodotto di PCR **224 bp** – evidenziato in **verde**, pattern di reazione  nel riquadro con sfondo **verde**.
- prodotto di PCR **123 bp** – evidenziato in **blu**, pattern di reazione  nel riquadro con sfondo **blu**.

Reazione N. 2: Devono apparire due bande specifiche nel gel.

- prodotto di PCR **154 bp** – evidenziato in **rosso**, pattern di reazione  nel riquadro con sfondo **rosso**.
- prodotto di PCR **390 bp** – evidenziato in **verde**, pattern di reazione  nel riquadro con sfondo **verde**.

Le altre reazioni di PCR si usano per la determinazione molecolare del locus genico *RHCE*. Una banda specifica per HGH, con una lunghezza del frammento di 434 bp è il controllo interno. Fa eccezione la reazione n. 2: qui la banda del controllo interno è di 659 bp (specifica per la sequenza genomica del cromosoma I, 90 kbp 5'del *Rhesus Box*).

Se il pattern di reazione indica una categoria D si dovrebbe eseguire un ulteriore esame con **Partial D-TYPE** per escludere mutazioni puntiformi che possano generare tale risultato.

4.6.4 Partial D-TYPE

Una banda mancante nella reazione nr. 4 potrebbe indicare DFR (positivo debole con anti-D in sierologia) o *RHD*Ψ (emi- od omozigote, D negativo in sierologia). Se manca un'informazione sierologia, è possibile ottenere una conferma o un'esclusione con l'uso di RH-TYPE. In presenza di weak D type 41 e 45 potrebbe verificarsi la mancanza della reazione 9. Anche mutazioni negli introni potrebbero causare fallimento delle reazioni 8 o 9. In presenza di Weak D type 20 la reazione 10 normalmente non mostra alcuna banda, anche se a volte può comparirne una debole.

Attualmente non è possibile una differenziazione genetica delle varianti D **DCS**, **DFW**, **DIM**, **DNU** da un *RHD* standard. E' utile la osservazione degli aplotipi.

4.6.5 D Zygosity-TYPE

Negli alleli *RHD*, che non possono essere determinati con il metodo sierologico (RhD neg.), può verificarsi una discrepanza tra il risultato del test sierologico e la tipizzazione genomica. La

determinazione positiva del Downstream *Rhesus Box* mostra la presenza di un allele *RHD* (*RHD* pos.), tranne *RHD Ψ* rispettivamente omozigote e emizigote. In questo caso la reazione è negativa anche in presenza di allele *RHD*.

Inoltre, il risultato con un Downstream *Rhesus Box* modificato geneticamente potrebbe essere anche un falso negativo, anche se il campione è sierologicamente D-positivo. Così, con un risultato sierologico D-positivo e una PCR positiva per l'Hybrid *Rhesus Box*, il risultato è quindi "Dd". Con una PCR negativa per l'Hybrid *Rhesus Box* il risultato è "DD".

A causa di un polimorfismo caratteristico nel Hybrid *Rhesus Box* degli Africani, potrebbe verificarsi un risultato falso positivo in presenza di un *RHD Ψ* e un ulteriore allele *RHD*.

Nel caso di un Hybrid *Rhesus Box* mancante nella popolazione nera, devono essere considerati i risultati per gli alleli *RHD Ψ* e *Cde^s* ottenuti con **RH-TYPE**. Con i kit attualmente disponibili non è possibile escludere ulteriori alleli *RHD* antigenici D negativi. Ciò è da tenere in considerazione nell'interpretazione dei risultati. Ciononostante, la incidenza di questi alleli nella popolazione bianca è piuttosto bassa.

Il DNA degradato può portare a risultati falsi negativi di entrambi il Downstream *Rhesus Box* e l'Hybrid *Rhesus Box*. Questo è indicato o solo dalle bande del controllo interno, o dalle bande mancanti.

5. Avvertenze e precauzioni

L'etidibromuro è un potente mutageno. Evitare il contatto con la pelle e contaminazioni. Consultare le avvertenze, le precauzioni e le istruzioni d'uso del produttore. Il transilluminatore UV emette onde a lunghezze molto corte che possono causare bruciature alla pelle e alla retina. Usare una maschera per la protezione facciale UV!

I materiali biologici impiegati per l'estrazione del DNA, per es. sangue o tessuto umano, devono essere maneggiati come potenzialmente infetti. Si consigliano precauzioni di sicurezza appropriate quando si maneggiano materiali biologici (non pipettare con la bocca; indossare guanti monouso quando si maneggia materiale biologico e si esegue il test; al termine del test disinfettare le mani). Il materiale biologico deve essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave). Il materiale smaltito deve essere autoclavato dopo l'uso.

La fuoriuscita di materiale potenzialmente infetto deve essere rimosso immediatamente con carta assorbente e le aree contaminate pulite con un disinfettante standard o con etanolo al 70%. Il materiale usato per pulire le fuoriuscite, incluso i guanti, deve essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave).

Lo smaltimento di tutti i campioni, reagenti non utilizzati e prodotti di rifiuto dovrebbe avvenire secondo le regolamentazioni nazionali, federali e locali.

Una dichiarazione riguardante le schede di sicurezza (MSDS) è disponibile dal sito di download: www.baghealthcare.com.

6. Soluzione dei problemi

Problema	Possibile causa	Soluzione
nessuna amplificazione, length standard visibile	DNA contaminato con inibitori di PCR DNA degradato	ripetere l'estrazione del DNA, provare metodi diversi
	concentrazione di DNA troppo alta / troppo bassa	modificare la concentrazione di DNA / ripetere l'estrazione di DNA
	enzima mancante o concentrazione troppo bassa	ripetere la tipizzazione, modificare la concentrazione dell'enzima
	DNA da sangue in eparina	ripetere la tipizzazione con sangue in EDTA
	parametri di amplificazione errati	ottimizzare i parametri di amplificazione (vedere 4.3) ☆
Ripetuto insuccesso in ciascun pozzetto (nessun controllo di amplificazione)	perdita nelle provette di reazione; evaporazione di acqua e variazione della concentrazione durante la PCR	chiudere bene le provette con i tappi; usare un'altra provetta di reazione
amplificazione aspecifica, bande addizionali, (bande addizionali di dimensioni errate devono essere tralasciate)	contaminazione con prodotti di amplificazione	ripetere la tipizzazione, assicurarsi dell'esatta procedura del lavoro, decontaminare
	DNA contaminato con sali	ripetere l'estrazione di DNA, provare metodi diversi
	concentrazione di DNA troppo alta	usare meno DNA
	concentrazione dell'enzima troppo alta	usare meno enzima
	parametri di amplificazione errati	ottimizzare i parametri di amplificazione (vedi 4.3) ☆
l'interpretazione mostra più di 2 specificità	-contaminazione carry-over -(prodotti di amplificazione!) -nuovo allele	controllare la Master Mix (senza aggiunta di DNA) assicurarsi dell'esatta procedura del lavoro, decontaminare
nessuna banda visibile o molto debole, length standard invisibile	colorazione EtBr troppo debole	ripetere la colorazione
lo sfondo del gel è troppo chiaro	colorazione troppo forte, concentrazione di EtBr troppo alta	immergere il gel in H ₂ O o TBE per diminuire la concentrazione di EtBr
bande confuse	-buffer per elettroforesi troppo caldo -errato buffer per elettroforesi	diminuire il voltaggio usare buffer TBE 0,5 x





☆ Quando si usano gli strumenti e i materiali elencati, considerare come ultima possibilità l'ottimizzazione dei parametri di amplificazione. In molti casi, è possibile interpretare il test eliminando le bande addizionali che hanno pesi molecolari non corretti.

7. Bibliografia

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

Ulteriore bibliografia è reperibile su www.bag-healthcare.com.

8. Spiegazione dei simboli sulle etichette

	Utilizzare entro
	Temperatura di conservazione
	Consultare istruzioni d'uso
	Sufficiente per n test
BLOOD TYPING	Destinazione d'uso: Tipizzazione eritrocitaria
CONT	Contenuto, contiene
HNA TYPING	Destinazione d'uso: Determinazione delle specificità HNA
HPA TYPING	Destinazione d'uso: Determinazione delle specificità HPA
IFU	Istruzioni d'uso
IVD	Per uso diagnostico in vitro
LOT	Codice batch
PCRBUF 10x	PCR buffer, concentrato 10x
PCRCAP	Tappini PCR
PCRPLATE	Piastre PCR
PCRSTRIP	Strip PCR
REACTIONMIX	Mix di reazione
REF	Numero di catalogo
RTU	Pronto all'uso
TAQ POLYMERASE	Taq Polimerasi
WORKSHEET	Worksheet

Per istruzioni d'uso in tutte le lingue si veda:

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

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

tel. +49 (0)6404-925-125