

Návod k použití souprav

BAGene DNA-SSP

Testovací soupravy pro AB0 typizaci, RH typizaci, pro typizaci systémů Kell, Kidd, Duffy a MNS i pro HPA a HNA specifikaci - (molekulárně biologická metoda)

IVD určeno pro in vitro diagnostiku



10/20 typizací.
předředěno, připraveno k použití

kat.č. REF 6640	BAGene AB0-TYPE	8 směsí	červená
kat.č. REF 6641	BAGene AB0-TYPE variant	16 směsí	červená
kat.č. REF 6645	BAGene RH-TYPE	13 směsí	purpurová
kat.č. REF 6646	BAGene Partial D-TYPE	16 směsí	žlutá
kat.č. REF 6647	BAGene Weak D-TYPE	8 směsí	bílá
kat.č. REF 6648	BAGene D Zygotity-TYPE	2 směsí	modrá
kat.č. REF 6650	BAGene KKD-TYPE	8 směsí	zelená
kat.č. REF 6652	BAGene MNS-TYPE	4 směsí	žlutá
kat.č. REF 6660	BAGene HPA-TYPE	12 směsí	modrá
kat.č. REF 6670	BAGene HNA-TYPE	7 směsí	bílá

Obsah

1. popis výrobku	3
2. materiál	8
2.1 obsah BAGene DNA-SSP souprav	8
2.2 potřebné vybavení a materiál	8
2.3 skladování a trvanlivost	8
3. údaje o kvalitě testu	8
4. pracovní postup	9
4.1 bezpečnostní pokyny a speciální poznámky	9
4.2 izolace DNA	10
4.3 amplifikace	10
4.4 elektroforéza	11
4.5 dokumentace a interpretace výsledků	12
4.6 vysvětlivky k pracovnímu listu a vyhodnocovacím diagramům	13
5. varování	14
6. problémy a jejich řešení	15
7. literatura	16
8. vysvětlení symbolů	19

1. Popis výrobku

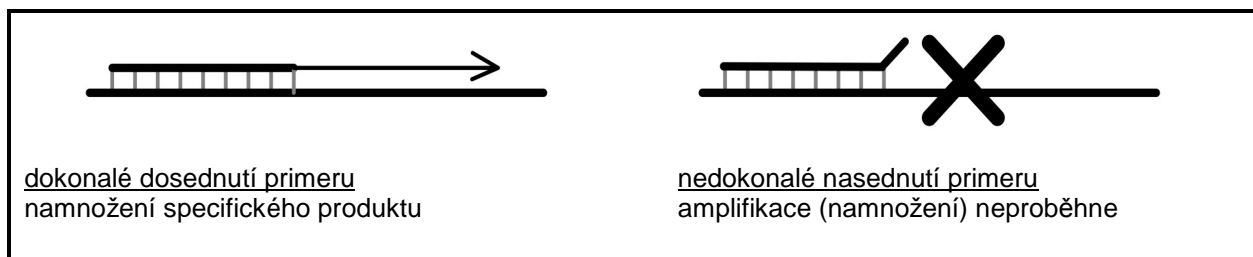
Využití PCR (polymerase chain reaction) k určování krevních skupin a destičkových alloantigenů prochází v poslední době mohutným rozvojem. V současnosti je technika PCR použitelná k dokončování, upřesňování a potvrzování výsledků sérologických testů. Sekvenování *ABO* skupin [1-13], *RHD/RHCE* [14-38], *Kell*, *Kidd*, *Duffy* [39-56], *MNSs* [57-60], *HPA* [61-66] a *HNA* alel [67-69] umožňuje jasnou typizaci dárců, příjemců a těhotných žen na úrovni DNA s vysokým rozlišením a má mnoho výhod oproti tradičním sérologickým metodám.

Základním materiálem pro typizaci pomocí soupravy **BAGene** DNA-SSP kit je purifikovaná (přečištěná) leukocytární DNA. Test je prováděn pomocí SSP (sequence specific primers – t.j. primery specifické pro danou sekvenci) – PCR, (viz obr. 1) [72,73]. Tato metoda je založena na zjištění, že

extenze primeru, a tudíž i úspěšná PCR je závislá na přesně odpovídajících sekvencích na 3' koncích obou primerů. Čili pouze když primery zcela přesně odpovídají testované sekvenci proběhne PCR a je možno následně pozorovat její produkt při gelové elektroforéze.

Složení jednotlivých směsí primerů umožňuje po vyhodnocení vyhodnocovacích diagramů jasnou identifikaci skupin *ABO*, *RH*, *KEL*, *JK*, *FY*, *MNSs* a *HPA* i *HNA* genotypů. Pro každou typizaci se používá určitý počet reakčních směsí (2, 4, 7, 8, 12, 13 nebo 16), které jsou dodávány **předředěné** (t.j. již namíchané v potřebných množstvích) a **sušené**. Směsi v sobě již zahrnují vnitřní amplifikační kontrolu. Celkové množství reakční směsi je 10 μ l.

obr. 1 Princip SSP-PCR



Molekulárně genetické určení skupin AB0

molekulárně genetické určení AB0 skupin se využívá v těchto případech:

- u novorozenců, neboť u nich ještě není exprese antigenů AB0 plně rozvinuta a navíc mohou být protilátky do novorozence přeneseny pasivně z matky
- v případě podezření na maskování originálního sérotypu po opakovaných, nebo masivních transfuzích cizích erytrocytů
- pro monitorování stavu po transplantaci kostní dřeně odlišné AB0 skupiny [9]
- pro forenzní účely

BAGene AB0 – TYPE a BAGene AB0 – TYPE variant

Charakteristickým znakem AB0 systému jsou terminální zbytkové sacharidy na uhlovodíkovém řetězci glykoproteinů a glykolipidů na povrchu buněk. Tyto modifikace jsou katalyzovány specifickými glykosyltransferázami. Proto antigenní vlastnosti nejsou přesně determinovány A, B nebo 0 geny, ale jsou geneticky určeny přítomností a aktivitou glykosyltransferáz. Přenos N-acetylgalactosaminu pomocí A transferázy a D galaktózy pomocí B transferázy vede k určení krevní skupiny A, respektive B. Jestliže je někdo nositelem krevní skupiny AB, pak má obě transferázy a naopak, nositelům krevní skupiny 0 obě transferázy chybí. Geny pro A i B transferázy leží oba na dlouhém raménku chromozómu 9 (9q34). Skládají se 7 exonů s celkovou délkou 1065 párů bazí (bp). Nejvýznamnější mutace

(substituce, delece a inserce) jsou lokalizovány na exonech 6 a 7.

V literatuře je popsáno 5 hlavních alel: **ABO*A101**, **ABO*A201**, **ABO*B101**, **ABO*O01** a **ABO*O03**. Dále bylo popsáno mnoho dalších variant a podskupin [1-13].

BAGene AB0-TYPE a **BAGene AB0-TYPE variant** umožňuje molekulárně genetické určení základních pěti alel a také běžné alely **ABO*O02** i variant A a B (t.j. **A³**, **A^x**, **A^{el}**, **A^w**, **B³**, **B^x**, **B^w**).

V současnosti neexistuje oficiální nomenklatura **AB0** alel a kromě zde v návodu použité existují i další nomenklaturní systémy. Nepřetržitě aktualizovaný seznam všech známých **AB0** alel lze nalézt v *The Blood Group Antigen Gene Mutation Database* na internetové adrese:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/systems_info&system=abo

Molekulárně genetické určení skupin Rh

V důsledku silné imunogenicity D antigenu a silné imunitní reakci D negativních osob po transfuzi D pozitivních erytrocytů je určení **RHD** typu velmi významné. [34]

Imunitní reakce u D negativních osob nastává například při:

- transfuzi D pozitivních erytrocytů
- při těhotenství D negativní matky s D pozitivním plodem

Přesné určení genetického základu D typu je významné při předcházení D imunizaci. Navíc D negativní koncentráty červených krvinek mohou být určeny s větší přesností. Neméně důležitá je i typizace alel **RHCE** při nejasných a slabých sérologických výsledcích.

Rozlišení D+/D+ a D+/D- u partnerů s D-negativní matkou ve smyslu určení D zygoticity má klinický význam při minimalizaci rizika MHN (**M**orbus **h**aemolyticus **n**eonatorum) [38] a umožňuje lepší těhotenskou péči.

BAGene RH-TYPE a BAGene RH-TYPE Asia

Dva **RH** geny, **RHD** a **RHCE** leží na krátkém raménku chromozomu 1 (p34.3 až p36.1) [14] Jejich 3' konce jsou obráceny směrem k sobě a odděleny 30 kbp (30 000

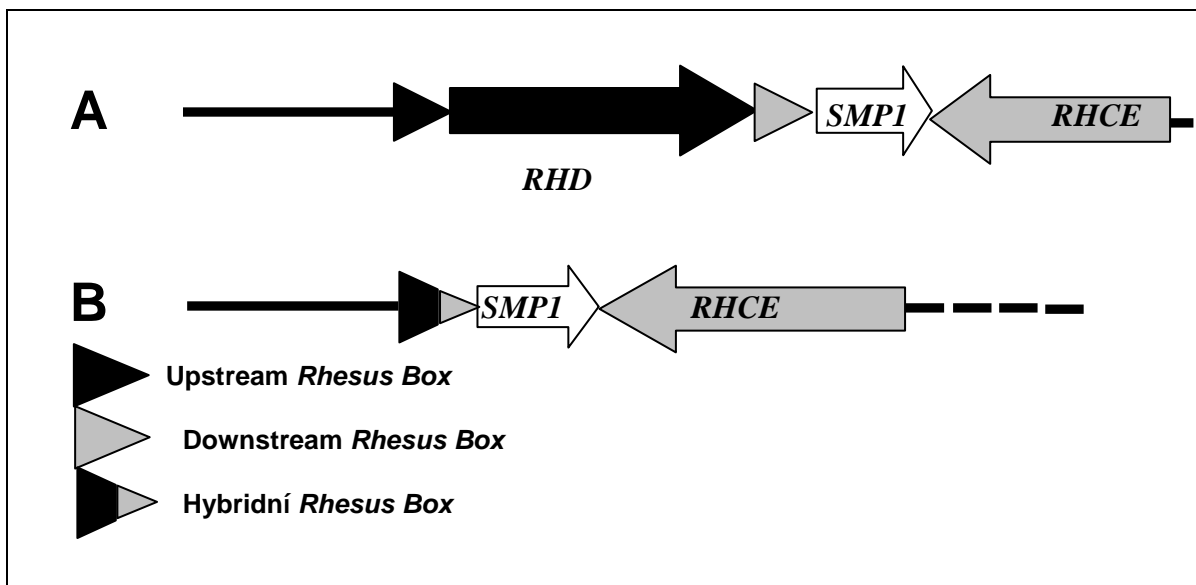
párů bazí). Další gen (**SMP1**) leží v této oblasti a také kóduje membránový protein [26].

RHD gen kóduje antigen D, **RHCE** gen pak antigeny C, c, E, e. Každý z **RHD** a **RHCE** genů se skládá z 10ti exonů s obvyklou velikostí 69 kbp.

Přibližně 18% evropské populace je sérologicky D-negativní. U takřka všech RhD negativních lidí kavkazské rasy gen **RHD** zcela chybí na obou chromozómech [28]. V dalších etnických skupinách (africké, asijské) a s malou četností též u evropské populace je přítomen zjevně nefunkční gen **RHD** i u fenotypicky RhD negativních jedinců. (Cde^s, **RHD**Ψ) [14, 15, 20, 21, 26-28, 30, 32-34].

BAGene RH-TYPE umožňuje molekulárně genetické určení standardních **RHD/RHCE** alel stejně jako typizaci několika **RHD** variant (D kat. VI, D kat. IV typ III, Cde^s, **RHD**Ψ, **RHD**(W16X), **RHD-CE**(8-9)-D, **RHD-CE**(3-7)-D [33] a také DEL typů (**RHD**(K409K), **RHD**(M295I), **RHD**(IVS3+1G>A)) [35]. Určení C^w je taktéž zahrnuto. V případě, že ve výsledcích vychází skupina D, měly by být provedeny další testy pomocí **BAGene Parcial D-TYPE**, aby se vyloučily bodové mutace jako příčina těchto výsledků.

RHD varianty (**RHD**(K409K), weak D (type 15, 17) se vyskytují s vyšší frekvencí u asijských etnických skupin a lze je prokázat pomocí **BAGene RH-TYPE Asia**.



Obrázek 2 : Model uspořádání *RHD* a *RHCE* genového lokusu [podle 26,27].
 2A uspořádání *RHD* a *RHCE* genových lokusů u *RHD* pozitivního haplotypu
 2B uspořádání u *RHD* negativního haplotypu

BAGene Partial D-TYPE a Weak D-TYPE

Variace v antigenní struktuře RhD vede buď k částečnému (partial D) nebo slabému D fenotypu (weak D).

Molekulárně genetické studium těchto D variant ukázalo, že slabý D fenotyp stejně jako některé z částečných D typů jsou způsobují bodové mutace. V další případech je částečný D fenotyp tvořen výměnou jednoho nebo více exonů genu *RHD* za odpovídající exony genu *RHCE*. V důsledku toho tedy vzniká kombinovaný RhD-CE-D protein. V těchto kombinovaných proteinech chybí kompletní epitopy proteinu RhD. Tím pádem jsou jedinci s takovýmto částečným D typem (t.j. s klinicky relevantní kategorií D VI) imunizovatelní transfuzí erytrocytů s kompletním RhD proteinem [16, 22, 34].

Tak, jak bylo popsáno v literatuře, substituce aminokyselin v částečných D fenotypech jsou

lokalizovány převážně v extracelulární části proteinu. Substituce aminokyselin u slabého D fenotypu jsou naopak omezeny převážně do intracelulární a transmembránové části RhD proteinu [22, 23, 25, 26, 28-31, 35].

BAGene Partial D-TYPE umožňuje molekulárně genetické stanovení D- kategorií **DII, DIII, DIV, DV, DVI, DVII** stejně jako částečný **DAU, DBT, DFR, DHMi, DHMii, DNB, DHAR (Rh33)** [16, 17, 19, 20, 22, 24, 25, 28, 36, 37]. Molekulárně genetické rozlišení D variant **DCS, DFW, DIM, DNU** od standardního *RHD* není v současnosti možné. Je žádoucí brát v potaz haplotypy.

BAGene Weak D-TYPE umožňuje molekulárně genetické určení slabých D typů **1, 2, 3, 4.0/4.1, 4.2, 5, 11, 15 a 17.**

BAGene D Zygosity-TYPE

U RhD pozitivního haplotypu je gen *RHD* lemován dvěma téměř homologickými sekvencemi DNA – tzv. Rhesus Boxy které jsou položeny na 5' (upstream Rhesus Box), respektive 3' (downstream Rhesus Box) směrem od genu *RHD*. (viz obr. 2A). Jelikož je

RhD gen negativních jedinců kavkazské rasy zcela vyštěpen na obou chromozómech, vzniká zde hybridní Rhesus Box vzniklý spojením 5' konce upstream Rhesus Boxu a 3' konce downstream Rhesus Boxu. (viz obr. 2B) [26, 27, 28].

BAGene D Zygosity TYPE umožňuje určení D-zygocity (t.j. homozygocity, nebo heterozygocity D fenotypu) pomocí molekulárně genetického průkazu přítomnosti **Downstream Rhesus Boxu** (homozygot **DD**) nebo **Hybrid Rhesus Boxu** (homozygot **dd**), respektive **Downstream a Hybrid Rhesus Boxu** (heterozygot **Dd**). Jelikož u černé populace chybí Hybridní Rhesus Box, je

v těchto případech nutno určit alely Cde^s , $RHD\psi$ pomocí **BAGene RH-TYPE** (reakce č. 2 a 8) souprav. Ani další D-antigenně RHD negativní alely nemohou být v současnosti dostupnými testovacími soupravami vyloučeny a tento fakt je třeba při interpretaci výsledků brát v úvahu. Na druhou stranu se tyto alely v bílé populaci vyskytují velice zřídka [33,38].

Molekulárně genetická typizace systému Kell, Kidd, Duffy (KKD)

Nejdůležitějšími antigeny Kell systému jsou $KEL1$ (K) a $KEL2$ (k – Cellano). $KEL1$ se věnuje největší pozornost pro jeho silnou imunogenicitu.

Antitické alely systému Kidd se nazývají JK^*A a JK^*B (Jk^a , Jk^b).

Nejdůležitější pro charakterizaci systému Duffy jsou FY^*A a FY^*B (Fy^a , Fy^b). Protilátky namířené proti antigenům KKD systému způsobují hemolytické transfúzní reakce a/nebo těžké případy MHN.

Přesný průkaz těchto protilátek v krvi dárců i pacientů je proto velmi důležitý.

BAGene KKD-TYPE [39-56]

Významný rozdíl mezi $KEL1$ a $KEL2$ (v sérologické nomenklatuře K a k - Cellano) je způsoben substitucí jediné báze v exonu 6 příslušného genu.

Systém Kidd je lokalizován na chromozómu 18 a tvoří ho tři typy Jk^a , Jk^b , Jk^- . Alely JK^*A , JK^*B Kidd systému se liší jedinou aminokyselinovou záměnou na pozici 280 daného antigenu.

Gen FY je lokalizován na chromozómu 1 a skládá se z alel FY^*A , FY^*B , FY^*X a

$FY^*null01$, na daném genovém lokusu může být zastoupena vždy jen jedna z nich. Podle serologické nomenklatury alela FY^*A odpovídá Fy^a antigenu a alela FY^*B odpovídá Fy^b antigenu. Slabě se projevující alela FY^*X (Fy^x) je sérologicky definována jako Fy^b ^{weak}. V africké populaci je fenotyp $Fy(a-b-)$ pozorován s frekvencí 68%, zatímco v Evropě je velice vzácný (< 0,1%). Jedinci se touto „tichou“ alelou zvanou $FY^*null01$ jsou rezistentní vůči patogenu způsobujícímu malárii terciánu (*Plasmodium vivax*) v důsledku nepřítomnosti antigenní determinanty.

Na rozdíl od sérologických technik umožňuje

BAGene KKD-TYPE jasnou identifikaci imunologicky významných alel Fy^b ^{weak} (Fy^*X) a $FY^*null01$.

BAGene KKD-TYPE SSP se skládá alespoň z 8 PCR směsí a umožňuje průkaz následujících charakteristik:

Kell (K, k) - KEL^*1 a KEL^*2

Kidd (Jk^a , Jk^b) - JK^*A a JK^*B

Duffy (Fy^a , Fy^b , Fy^{null} , Fy^x) - FY^*A , FY^*B , $FY^*null01$ a FY^*X

Molekulárně genetická typizace systému MNS pomocí BAGene MNS-TYPE

Antigeny **M** a **N** byly objeveny roku 1927 Landsteinerem and Levinem [57], **S** a **s** roku 1947 Walshem a Montgomerym [58]. Lidské glykophoriny jsou hlavními sialoglykoproteiny vystavenými na membráně červených krvinek nesoucích antigeny MNS systému. [59]. Glycophorin A (GPA) má dvě alelické formy nesoucí M nebo N antigen. Glycophorin B (GPB) se také vyskytuje ve dvou alelických formách, které nesou antigeny S nebo s. GPA

a GPB jsou kódovány geny **GYPA** a **GYPB**, které jsou členy genové rodiny na chromozómu 4 [60].

BAGene MNS-TYPE [57-60]

Souprava umožňuje typizaci čtyř hlavních alel MNS systému (**M**, **N**, **S** a **s**) na molekulárně genetickém základu.

Molekulárně genetická typizace trombocytárních antigenů (HPA)

Alloimunní trombocytopenie jako je neonatální alloimunní trombocytopenie, post-transfuzní purpura nebo refrakternost po transfuzi trombocytárních náplavů mohou být způsobeny v průběhu těhotenství nebo jako následek transfuze destrukcí trombocytů způsobenou tvorbou protilátek proti specifickým trombocytárním antigenům (HPA) nacházejícím se na destičkových membránových proteinech. Přesná typizace HPA je nezbytná pro správné rozhodnutí a podání odpovídajících krevních komponent pro pacienty s tímto typem nemocí [61-66].

BAGene HPA-TYPE

Trombocytární antigeny HPA (**human platelet antigen**) reprezentují skupinu polymorfních alelických markerů lokalizovaných na lidských trombocytárních glykoproteinech GPIIb/IIa, GPIa, GPIb α a GPIb β . Polymorfismus je založen na bodových mutacích způsobených výměnou jednotlivých aminokyselin [65].

BAGene HPA-TYPE umožňuje molekulárně biologickou typizaci HPA genotypů **HPA-1a/b**, **HPA-2a/b**, **HPA-3a/b**, **HPA-4a/b**, **HPA-5a/b**, **HPA-15a/b**.

Molekulárně genetická typizace HNA specifit

Neonatální alloimunní neutropenie (NIN) nebo akutní poškození plic spojené s transfuzí (TRALI) jsou způsobeny protilátkami proti antigenům lidských neutrofilů. Imunizace může nastat při transfuzi, nebo během těhotenství. Bezpečné určení HNA specifit je nezbytné pro diagnózu a získání krevních preparátů potřebných pro pacienty trpícími těmito syndromy [67-69].

BAGene HNA-TYPE

Antigeny granulocytů HNA (**human neutrophil antigens**) jsou projevem polymorfní skupiny alel, přítomny jsou na povrchu lidských neutrofilních granulocytů. Klinicky významné alloantigeny jsou **HNA-1a** (NA1), **HNA-1b** (NA2) a **HNA-1c** (SH) z Fc γ RIIIb glykoproteinů [67]. Dalšími klinicky relevantními antigeny jsou **HNA-4a** (Mart) a **HNA-5a** (Ond) které patří do skupiny β_2 -integrinů [68, 69]. **BAGene HNA-TYPE** umožňuje molekulárně biologickou typizaci HNA specifit **HNA-1a/b/c**, **HNA-4a/b**, **HNA-5a/b**.

2. Materiál

2.1. obsah souprav BAGene / DNA-SSP

- 10 nebo 20 **BAGene** destiček/stripů určených pro 10 respektive 20 typizací. Předředěné a vysušené reakční směsi se skládají z primerů specifických pro dané alely, primerů vnitřní kontroly (specifické pro gen HGH – lidský růstový hormon [71] a chromozom I genomické sekvence nebo 90 kbp 5' Rhesus Boxu) a nukleotidů. První reakční směs je značena (PCR stripy: vytištěným číslem šarže okolo první reakční komůrky, PCR destičky: vytištěným číslem šarže nad první reakční komůrkou).
- 10xPCR pufr pro 10 respektive 20 typizací
- víčka ke stripům (po 12ti) v množství dostačujícím pro 10 respektive 20 typizací
- návod k použití, pracovní listy a vyhodnocovací diagram

Jako doplněk k **BAGene RH-TYPE** je dodáván DNA délkový standard pro měření fragmentů při gelové elektroforéze (např. ABgene Co. superladder-low 100 bp)

2.2. potřebné vybavení a materiál

- Taq polymeráza (5U/μl, např. Qiagen) **!! Nepoužívejte hot start Taq Polymerázu !!** (např. Ampli Taq Gold)
- souprava **BAG EXTRA GENE** pro extrakci DNA z krve, lymfocytů či

leukocytů, případně jiné vybavení pro izolaci genomické DNA

- DNA délkový standard pro gelovou elektroforézu (s výjimkou **BAGene RH-TYPE**)
- pipety s rozsahem 0,5-250 μl
- sterilní špičky s integrovaným vnitřním filtrem
- DNA cyklér s vyhříváním a nastavitelným víkem (např. PTC 200, MJ Research/Bio-Rad)

přístroje a chemikálie pro gelovou elektroforézu

- DNA agaróza
- 0,5 x TBE pufr (45 mM Tris, mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA)
- ethidium-bromid (EtBr)
- jednotka pro elektroforézu
- zdroj napětí (200-300 v. 200 mA)

přístroje a potřeby pro dokumentaci a vyhodnocení výsledků

- zdroj UV záření (transiluminátor, λ=220-310 nm)
- fotoaparát (digitální, Polaroid)

2.3. skladování a stabilita

Souprava je dodávána nezmražená. Skladujte všechny reagenty při -20 až -80° C v temnu. Datum expirace je uvedeno na víčku každé z reagentů. „Shelf life“ t.j. doba skladovatelnosti po prvním použití je uvedena na vnějším popisku a vztahuje se na reagenty s nejkratší dobou životnosti. Rozpouštějte 10xPCR pufr těsně před použitím.

3. Údaje o kvalitě testu

analytická senzitivita

Kvalitní typizace je zaručena při použití 50 - 100ng DNA na reakční směs.

Z důvodu delšího trvání PCR programu při provádění **BAGene D Zygosity-TYPE** doporučujeme použít menší množství DNA na reakci (30-50 ng)

diagnostická specifita

Složení primerů zaručuje identifikaci alel uvedených v pracovních listech a vyhodnocovacích diagramech.

Diagnostická senzitivita a specifita každého primeru byla testována na DNA z referenčních vzorků. Alely, které nejsou v současnosti dostupné a nebyly testovány z důvodů jejich vzácnosti, jsou v pracovních listech a vyhodnocovacích diagramech značeny **n.t.** (not tested currently, doposud netestováno)

Studie byly prováděny pro všechny soupravy **BAGene DNA-SSP** na předem typizovaných vzorcích. Výzkum prokázal jasnou shodu s předcházejícími sérologickými a/nebo genomickými typizacemi.

4. Pracovní postup

4.1. Bezpečnostní pokyny a speciální poznámky

PCR je vysoce citlivá metoda, která by měla být prováděna osobou se zkušeností s prací v molekulárně biologické laboratoři.

Současné poznatky z transfuzní medicíny a určování krevních skupin stejně jako transfuzní anamnézy musí být brány v potaz, aby se snížilo možné riziko falešných typizací, obzvláště v případě kdy molekulárně biologicky a sérologicky získané výsledky nejsou ve shodě. Genotypizace *ABO* i *RHD/RHCE*, stejně jako *KKD*, *MNSs*, *HPA* a *HNA* by měly být prováděny po vyhodnocení sérologických testů.

Obecné omezení molekulárně genetických typizací pomocí souprav **BAGene DNA SSP**:

Pokud pomocí soupravy **BAGene** nezískáme jasné výsledky (např. z důvodu neznámé alely, která nemůže být prokázána současnými primery) je nutno postupovat podle národních standardů a pracovat podle sérologických dat. Doporučujeme sekvenční analýzu takovýchto vzorků. Výsledky typizací musí být interpretovány s přihlédnutím na genetickou variabilitu v různých etnických skupinách. V případě pochyb je rozhodující určení na základě fenotypu.

Omezení při určování krevních skupin *ABO*

Jelikož lze pomocí **BAGene ABO-TYPE variant** prokázat jen část z množství variant alel *A*, jsou ostatní jsou neodlišitelné od alely ***ABO*A101***. Jelikož lze pomocí **BAGene ABO-TYPE variant** prokázat jen část z množství variant alel *B* a žádné varianty *A²*, mohou být ostatní variantní *B* alely, nebo variantní *A²* skryty pod výsledky PCR ***ABO*B101*** a ***ABO*A201***. Většina *B^(A)* a *cis AB* alel taktéž vycházejí pozitivní při reakce se skupinou ***ABO*B101***.

Omezení a poznámky k typizaci *D* zygocity

U *RHD* alel, které nemohou být rozlišeny sérologicky (t.j. u RhD neg.) může dojít k rozporu mezi výsledky molekulárně biologickými a sérologickými. Pozitivní identifikace Downstream *Rhesus Boxu* znamená přítomnost alely *RHD* t.j. (*RHD* pozitivní) s výjimkou *RHDΨ* heterozygotů i

homozygotů. Zde je reakce negativní, ač je alela *RHD* přítomna.

Navíc v případech geneticky pozměněného Downstream *Rhesus Boxu* je možné, že výsledky budou také falešně negativní, ačkoliv je pacient sérologicky *D*-pozitivní. Čili u sérologicky *D*-pozitivních pacientů a pozitivní PCR pro Hybridní *Rhesus Box* je interpretací "*Dd*" a "*DD*" pro výsledky s negativní PCR Hybridní *Rhesus Box*.

V důsledku velkého polymorfizmu Hybridního *Rhesus Boxu* u Afričanů se mohou vyskytovat falešně pozitivní výsledky u *RHDΨ* i dalších *RHD* alel.

Degradovaná DNA může vést k falešně negativním výsledkům jak u Downstream *Rhesus Boxu* tak i u Hybridního *Rhesus Boxu*. V důsledku toho jsou patrné pouze proužky vnitřní kontroly, nebo chybí proužky zcela.

Omezení a poznámky k typizaci partial *D*

Chybějící proužek v reakci č. 4 může indikovat DFR (slabě pozitivní s anti-*D*) nebo *RHDΨ* (hetero- nebo homozygot, v sérologii *D* negativní). Pokud chybí sérologická informace, lze potvrdit, nebo vyloučit *RHDΨ* pomocí **BAGene RH-TYPE**.

Práce vyžaduje velkou opatrnost, aby bylo pokud možno vyloučeno nebezpečí kontaminace vzorků a tím pádem i falešných výsledků! Proto :

- používejte při práci rukavice (pokud možno bez pudru)
- pro každé pipetování používejte nové sterilní špičky (s integrovaným filtrem)
- vyčleňte oddělené pracovní prostory pro jednotlivé pracovní kroky - t.j. předamplifikační (izolace DNA a příprava reakčních směsí) a postamplifikační (gelová elektroforéza a dokumentace), nejlépe ve dvou místnostech
- používejte pomůcky a přístroje jen pro daný krok a nevyměňujte je navzájem.

4.2. Izolace DNA

Pro testy **BAGene** potřebujeme cca 5-10 ng DNA (což odpovídá přibližně 0,5 ml krve). Souprava **BAG EXTRA-GENE** je pro izolaci DNA nejvhodnějším řešením, neboť čistá DNA může být získána z plné krve za krátkou dobu a to bez použití toxických chemikálií a rozpouštědel. Ovšem i jiné, v literatuře popsané metody [70], jako je chloroform-

triethyl-amonium-bromid (CTAB) metoda nebo fenol-chloroformová purifikace poskytují dostatečně čistou DNA. Přítomnost heparinu v reakční směsi může inhibovat PCR [71], proto se doporučuje použití EDTA nebo citrátové krve. DNA by měla mít index čistoty (poměr extinkcí při OD₂₆₀ / OD₂₈₀) mezi 1,5 a 2,0.

4.3. Amplifikace

Všechny předředěné a sušené reakční směsi již obsahují nukleotidy, alely a kontrolní specifické primery. Tato směs je usušená na dně reakčních komůrek. Parametry amplifikace jsou nastaveny pro celkový objem reakce 10 μ l.

1: Vyjměte odpovídající počet **BAGene** destiček z -20 až -80°C a rozeďte 10xPCR pufr na pokojovou teplotu.

2: Napipetujte MasterMix z 10xPCR pufru, roztoku DNA, Taq polymerázy a redestilované vody a dobře promíchejte. Všechny **BAGene** testovací soupravy pracují se stejným MasterMixem a lze tedy používat tentýž pro všechny BAGeny testy. Následující TAB. 1. udává složení MasterMixů v závislosti na počtu prováděných testů:

počet mixů	roztok DNA(*) (50-100 ng/ μ l) (**)	H ₂ O	10xPCR pufr	Taq polymeráza (5U/ μ l)	celkový objem
1	1 μ l	8 μ l	1 μ l	0,08 μ l	10 μ l
2	2 μ l	16 μ l	2 μ l	0,02 μ l	20 μ l
6(***)	7 μ l	50 μ l	7 μ l	0,5 μ l	65 μ l
7	9 μ l	70 μ l	9 μ l	0,7 μ l	90 μ l
8	10 μ l	80 μ l	10 μ l	0,8 μ l	100 μ l
9	11 μ l	88 μ l	11 μ l	0,9 μ l	110 μ l
10	12 μ l	96 μ l	12 μ l	1,0 μ l	120 μ l
11	13 μ l	104 μ l	13 μ l	1,0 μ l	130 μ l
12	14 μ l	112 μ l	14 μ l	1,1 μ l	140 μ l
13	16 μ l	128 μ l	16 μ l	1,3 μ l	160 μ l
14	17 μ l	136 μ l	17 μ l	1,4 μ l	170 μ l
15	18 μ l	144 μ l	18 μ l	1,4 μ l	180 μ l
16	19 μ l	152 μ l	19 μ l	1,5 μ l	190 μ l

(*) při odlišných koncentracích DNA musí být změněno množství roztoku a k tomu odpovídajícím způsobem i množství H₂O, (např. pro 12 mixů a koncentraci DNA 120ng/ μ l použijte 5,8 μ l DNA a 119 μ l H₂O).

(**)Při práci se soupravou **BAGene D Zygoty-TYPE** je doporučeno množství DNA 30-50 ng/ μ l.

(***) doporučujeme připravovat MasterMix pro minimálně 6 reakcí, neboť u menších objemů je množství Taq polymerázy extrémně nízké a hrozí značná chyba při pipetování směsi.

3: Po promíchání na Vortexu přeneste **10 µl** této reakční směsi (MasterMixu) do předkapaných jamek. Vyměňte špičku po každém pipetování. Pevně uzavřete reakční komůrky odpovídajícím víčkem. Dávejte pozor ať se nedotknete vnitřní části víčka ani horního okraje reakčních komůrek prsty z důvodu nebezpečí kontaminace. Při použití cykléru s těsně uzavíratelným víkem je možné použít opakovaně použitelné PCR krycí fólie. Lehce hýbejte destičkou aby se modrý pelet na dně reakční komůrky rozpustil. Veškerá reakční směs by měla být na dně reakční komůrky.

4: Vložte reakční zkumavky do termocykléru a pevně uzavřete víko tak, aby se reakční komůrky při zahřívání nezdeformovaly. Zahajte PCR program. Překrývání minerálním olejem není u cyklérů s nastavitelným a vyhříváním víkem potřeba.

Značení →

Lot no.	
①	⑨
②	⑩
③	.
④	.
⑤	.
⑥	.
⑦	.
⑧	.

Nastavení PCR cykléru pro soupravy **BAGene** (vyjma BAGene D Zygosity-TYPE)

krok	doba	teplota	počet cyklů
první denaturace	5 minut	96°C	1 cyklus
denaturace	10 sekund	96°C	5 cyklů
annealing a prodlužování	60 sekund	70°C	
denaturace	10 sekund	96°C	10 cyklů
annealing	50 sekund	65°C	
prodlužování	45 sekund	72°C	
denaturace	10 sekund	96°C	15 cyklů
annealing	50 sekund	61°C	
prodlužování	45 sekund	72°C	
závěrečné prodlužování	5 minut	72°C	1 cyklus

POZOR: PRO BAGene D Zygosity-TYPE JE ODLIŠNÝ PROGRAM

krok	doba	teplota	počet cyklů
první denaturace	10 minut	95°C	1 cyklus
denaturace	20 sekund	92°C	35 cyklů
annealing	30 sekund	64°C	
prodlužování	5 minut	68°C	
závěrečné prodlužování	5 minut	72°C	1 cyklus

typy cyklérů: např. PTC 100/200 (MJ Research/BioRad), GeneAmp PCR-System 9600/9700 (ABI Co.)

Jelikož cykléry od různých výrobců někdy pracují poněkud odlišně a někdy se dokonce liší jednotlivé přístroje stejného typu, může vzniknout potřeba optimalizovat reakční parametry pro váš konkrétní cyklér.

Pro optimalizaci postupujte následovně:

Při falešně pozitivních reakcích (nespecifické proužky (bandy), další alely atd.) zvyšujte teplotu annealingu v krocích po 1°C.

Při falešně negativních výsledcích (t.j. chybějící proužky (bandy)) snižujte v krocích po 1°C teplotu annealingu a/nebo prodlužujte dobu trvání annealingu v 5ti vteřinových krocích, a/nebo prodlužujte dobu trvání denaturace v opět 5ti vteřinových krocích.

Doporučujeme používat jen pravidelně kalibrované cykléry.

Pro provedení kalibrace vašeho cykléru lze použít např. soupravu BAG-Cycler Check kit (katalogové číslo 7104).

Testy kvality výše uvedených výrobků byly prováděny na cyklérech PTC 200 a PTC 100 firmy MJ Research a 9700 od firmy ABI.

4.4. Gelová elektroforéza

Separace (oddělení) produktů amplifikace je prováděna pomocí horizontální gelové elektroforézy na agarózovém gelu. Jako pufr by měl být pro elektroforézu použit 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45mM kyselina borová, 0,5 mM EDTA). Koncentrace gelu by měla být 2,0-2,5% agarózy. Nechte gel polymerizovat alespoň 30 minut před nanesením vzorků. Po provedení amplifikace vyjměte vzorky z cykléru a přeneste celkový objem pečlivě do jamek v gelu. Neopomeňte dát do samostatné jamky též 10 μ l DNA délkového standardu pro měření délky fragmentů. Elektroforetická separace se provádí při 10-12 V/cm, (t.j. při cca 20cm

vzdálenosti mezi elektrodami při 200-240V), po dobu 20-40 minut. Pro **BAGene D Zygosity-TYPE** doporučujeme 40ti minutový běh elektroforézy, který nám jasněji oddělí jednotlivé proužky. Po proběhnutí elektroforézy je gel nabarven v roztoku Ethidium bromidu (přibližně 0,5 μ g EtBr na 1ml H₂O nebo TBE pufru). Alternativním postupem barvení je přidání EtBr (0,5 μ g/ml) do elektroforetického pufru či přímo do gelu. Pokud je to nutné, lze odstranit přebytečný EtBr namočením gelu na dobu 20-30 minut do vody.

4.5. Dokumentace a interpretace výsledků

Pro zviditelnění a zdokumentování vašich výsledků prosviňte gel po provedení elektroforézy UV světlem (transiluminátor, $\lambda=220-310$ nm) a vyfotografujte odpovídajícím fotoaparátem (digitálním či klasickým), filtry a filmem (např. při použití systému polaroid film typu 667). Nastavte čas i clonu tak, aby jednotlivé proužky jasně vystupovaly proti pozadí a žádné nechyběly.

Pro interpretaci výsledků použijte vyhodnocovací diagram, pouze proužky s odpovídající délkou (odečtenou podle DNA délkového standardu (např. superladder-low 100 ladder, Abgene Co. který je dodáván v soupravě **BAGene RH-TYPE** musí být nanesen alespoň do jedné jamky na každém gelu, pro podrobnější návod k jeho použití

prostudujte návod výrobce) by měly být vyhodnoceny jako pozitivní. Správnou velikost jednotlivých proužků lze nalézt v pracovních listech a vyhodnocovacích diagramech. Ve všech drahách bez specifických produktů jednotlivých alel musí být patrná vnitřní kontrola o délce **434 bp** (s výjimkou **D-Zygosity-TYPE** a druhé PCR u **RH-TYPE**, kde je délka fragmentu vnitřní kontroly **659 bp**). V drahách s pozitivními výsledky pro dané alely je produkt vnitřní kontroly slabší, nebo může zcela chybět z důvodu kompetice o chemikálie v dané PCR reakci. V případě nejasných výsledků nalistujte kapitolu 6. – Řešení problémů (6) .

4.6. Vysvětlivky k pracovním listům a vyhodnocovacím diagramům

Obecně

Výsledky molekulárně genetické typizace krevních skupin pomocí souprav **BAGene** je nutné zapsat do pracovních listů, které slouží k dokumentaci.

Přehled charakteristik, specifit, fenotypů, genotypů a vyobrazení reakčních vzorů ve smyslu příkladů v evaluačních diagramech slouží jako pomoc při interpretaci vašich výsledků. PCR reakce mají svoje čísla (např. u soupravy **ABO-TYPE** jsou to reakce 1-8).

Délka fragmentu specifického produktu PCR (specifický proužek) je uváděna v bp (base pairs – v párech bazí). Ve řádcích níže jsou uváděny možné vzory proužků na gelu. Specifické PCR produkty (pozitivní reakce)

jsou znázorněny **+** a odpovídající políčka v tabulce jsou barevně vyplněna (**ABO-TYPE**, **ABO-TYPE variant**, **partial D-TYPE**, **weak D-TYPE**, **D Zygotity-TYPE**, **KKD-Type**, **MNS-Type**, **HPA -TYPE**, **HNA-TYPE** zelenou, u soupravy **RH-TYPE** pak červenou, růžovou a modrou **RH-TYPE Asia** další modrou).

Nepřítomnost specifického proužku v dané reakci je v tabulkách značena v bílém rámečku **-**.

Vyhodnocení reakčních výsledků (vzorků) je prováděna v řádcích od leva doprava (tak jak je naznačeno červenou šipkou v pracovním listu) a předpokládá se i vyplnění informací o daném vzorku a výsledku elektroforézy.

BAGene ABO-TYPE [8] a **BAGene ABO-TYPE variant** [6, 7, 10, 13]

Homozygotická exprese alel *ABO*O01*, *ABO*O03*, *ABO*B101*, *ABO*A201* se projeví specifickými proužky v odpovídajících PCR reakcích (dráha 1, 3, 5 a 7). V případě heterozygocity musí být navíc proužky ve všech 4 "nereakčních" drahách (t.j. 2,4,6 a 8) k stávajícím 2 PCR specifickým reakcím (1,3,5 a 7). Homozygocita alely *ABO*A101* se projeví pouze proužky pro „non reakce“ (2, 4, 6, 8) neboť zde není specifická reakce pro alelu *ABO*A101*. Heterozygocitu alely *ABO*A101* lze rozpoznat podle další proužků v reakčních

drahách pro dané alely specifických reakcí (1,3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 nebo 16).

Podrobný popis a vysvětlení naleznete na příbalovém letáku v každé soupravě **BAGene ABO-TYPE variant**. Prosíme, prostudujte speciální poznámky na pracovních protokolech a evaluačních diagramech pro **ABO-TYPE** i **ABO-TYPE variant**.

Je nezbytné brát v potaz omezení molekulárně genetické typizace krevních skupin **ABO**. Proužek specifický pro **HGH** (fragment o délce 434 bp) slouží jako vnitřní kontrola (viz výše).

BAGene RH-TYPE [18, 20, 32, 33, 35]

Reakce **1-8** (**RH-TYPE**) slouží k molekulárně genetické typizaci standardních *RHD* stejně jako některých *RHD*-variant (*RHD* pozitivní haplotypy u sérologicky **D** negativních pacientů, částečné **D**).

Reakce 1 a 2 jsou multiplex PCR reakce (pracují se směsí primerů) pro vyšetřování pěti parametrů *RHD* polymorfizmu (*RHD* introny 4 a 7, exon 7 stejně jako *RHD* (*W16X*) a *RHD*Ψ). To znamená, že narozdíl od ostatních

BAGene DNA SSP testů (nepočítaje v to proužky vnitřní kontroly) se může objevit v dané dráze více než jeden proužek. K usnadnění vyhodnocení jsou odpovídající políčka v rozdělena na více částí a mají vícebarevné pozadí. Délka daného fragmentu je vypsána barvou odpovídající barvě pozadí daného políčka.

BAGene RHD-TYPE Asia [23, 25, 31, 33, 35]

Reakční směs 1 je multiplexová PCR pro testování *RHD* polymorfizmu exonů 4 a 7 (viz výše vysvětlení pro RH-TYPE).

Příklad pro *RHD*Ψ:

Reakce č. 1: Na gelu se musí objevit dva specifické proužky.

PCR produkt o délce 224 bp (značen zeleným písmem a v políčku pak na zeleném podkladu)

PCR produkt o délce 123 bp (značen modrým písmem a v políčku políčku pak na modrém podkladu)

Reakce č. 2: Na gelu se musí objevit dva specifické proužky.

PCR produkt o délce 154 bp (značen červeným písmem a v políčku políčku pak na červeném podkladu)

PCR produkt o délce 390 bp (značen zeleným písmem a v políčku pak na zeleném podkladu)

Reakce 9-13 slouží k molekulárně genetické typizaci *RHCE* genového lokusu.

Proužek specifický pro HGH (fragment o délce 434 bp) slouží jako vnitřní kontrola (viz výše). Výjimkou je PCR reakce č. 2, kde má kontrolní proužek délku 659 (specifický pro genomickou sekvenci chromozomu I, 90 000 bp 5' *Rhesus boxu*)

Soupravy **BAGene Partial D-TYPE** [20, 22, 24, 25, 28, 35-37], **Weak D-TYPE** [23, 25, 31], **D Zygosity-TYPE** [38] a **KKD-TYPE** [56], **MNS-TYPE** [59], **HPA-TYPE** [66], **HNA-TYPE** [67]

Interpretace výsledků podle obecného návodu ze strany 13, kap. 4.6. – Obecné.

5. Varování a bezpečnostní pokyny

Ethidium bromid (v textu zkracován často jako EtBr) je silný mutagen!!! Zabraňte kontaktu s kůží a jakýmkoli kontaminacím. Prostudujte pečlivě varování a bezpečnostní pokyny výrobce. Velmi krátké vlny používané při prosvěcování gelu UV zářením mohou způsobit popáleniny na kůži a především na sítnici. Používejte ochranné pomůcky jako je ochranný obličejový štít apod.!!!

Veškerý biologický materiál použitý pro extrakci DNA, t.j. krev a lidské tkáně je nutno považovat za potenciálně infekční a s jako takovými s nimi musí být zacházeno. Při práci s biologickým materiálem by tedy měly být dodržovány odpovídající pracovní postupy

(např. nepipetovat ústy, používat jednorázové rukavice, desinfikovat ruce po ukončení práce). Biologický materiál by měl být deaktivován před likvidací např. sterilizací v autoklávu. Jednorázové pomůcky, špičky atd. by měly být před likvidací také deaktivovány v autoklávu nebo spáleny.

Pokud dojde k rozliti potenciálně infekčního materiálu, měl by být tento OKAMŽITE odstraněn papírovými utěrkami a místo ošetřeno standardními desinfekčními prostředky nebo 70% alkoholem. Veškerý materiál použitý k čištění by měl být před likvidací deaktivován (viz výše).

6. Problémy a jejich řešení

problém	možný důvod	řešení
žádné produkty amplifikace nejsou na gelu patrné, délkový DNA standard je viditelný	DNA kontaminována blokátory PCR reakce	opakujte izolaci DNA, použijte jinou extrakční metodu
	degradovaná DNA	opakujte izolaci DNA, použijte jinou extrakční metodu
	koncentrace DNA je příliš vysoká / nízká	změňte koncentraci DNA, opakujte izolaci DNA
	koncentrace enzymu je příliš nízká, nebo enzym chybí	opakujte PCR a změňte koncentraci enzymu
	DNA z heparinové krve	opakujte PCR s EDTA krví
	špatné parametry amplifikace	optimalizujte amplifikační parametry (viz 4.3.) (*)
opakované chyby v jednotlivých reakcích, (reakční kontrola není patrná)	netěsnosti v reakčních zkumavkách, změna koncentrace v průběhu PCR v důsledku ztráty vody (1)	uzavírejte pečlivě reakční zkumavky
nespecifické amplifikační produkty, (jakékoliv další proužky odlišných délek jsou vyloučeny)	kontaminace dalšími amplifikačními produkty	opakujte typizaci, provádějte práci pečlivě a bezchybně
	DNA kontaminována solemi	zopakujte izolaci DNA, použijte jiné metody izolace
	příliš vysoká koncentrace DNA	použijte méně DNA
	koncentrace enzymu je příliš vysoká	použijte méně enzymu
	špatné parametry amplifikace	optimalizujte amplifikační parametry (viz 4.3.) (*)
při vyhodnocení gelu jsou viditelné více než 2 alely v jedné dráze	zanesena kontaminace, kontaminace amplifikačními produkty, nová alela	zkontrolujte chemikálie, nebyla přidána DNA, zajistěte přenou práci
žádné, nebo velmi slabé proužky, délkový DNA standard není patrný	barvení EtBr je slabé	opakujte barvení
pozadí na gelu svítí příliš silně	barvení bylo příliš dlouhé, koncentrace EtBr je příliš vysoká	namočte gel do vody nebo TBE a tím snižte koncentraci EtBr
rozmazané, nezřetelné proužky	příliš horký pufr při elektroforéze, příliš vysoké napětí, špatný pufr	snižte napětí použijte 0,5 x TBE pufr

(1) i pokud používáte vybavení a chemikálie doporučené v návodu, měla by být optimalizace cykléru a PCR reakce až poslední možností. Ve většině případů lze vyhodnotit testy odstraněním dodatečných proužků způsobených rozdíly ve velikosti.

7. Literatura

• **BAGene ABO-TYPE**

1. **Ferguson-Smith MA**, Aitken DA, Turleau C, de Grouchy J: Localisation of the human ABO: Np-1: AK-1 linkage group by regional assignment of AK-1 to 9q34. *Hum Genet* 1976;34:35-43
2. **Yamamoto F**, Clausen H, White T, Marken J, Hakamori S: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990; 345:229-33
3. **Yamamoto F**, Hakamori S: Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J Biol Chem* 1990;265: 19257-62
4. **Yamamoto F**, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T, Judd WJ, Davenport RD: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 1. Weak subgroups: A³ and B³ alleles. *Vox Sang* 1993;64:116-9
5. **Yamamoto F**, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. A^x and B^(A) alleles. *Vox Sang* 1993;64:171-4
6. **Chester MA**, Olsson ML. The ABO blood group gene: A locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev* 2001;15:177-200
7. **Yip SP**. Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet* 2002;66:1-27.
8. **Gassner C**, Schmarda A, Nussbaumer W, Schönitzer D: ABO Glycosyltransferase Genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996 88:1852-6
9. **Müller TH**, Hallensleben M, Schunter F, Blasczyk R: Molekulargenetische Blutgruppendiagnostik. *Dt Ärztebl* 2001;98:A 317-322 [Heft 6]
10. **Seltsam A**, Hallensleben A, Kollmann A, Burkhart J, Blasczyk R. Systematic analysis of the ABO gene diversity within exons 6 and 7 by PCR-screening revealed new ABO alleles. *Transfusion* 2003; 43: 428-39
11. **Olsson ML**, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: Identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001;98:1585-93
12. **Seltsam A**, Hallensleben M, Kollmann A, Blasczyk R: The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood* 2003;102:3035-42
13. **Seltsam A**, Das Gupta C, Wagner FF, Blasczyk R. Non-deletional ABO*O alleles express weak blood group A phenotypes. *Transfusion* 2005;45: 359-65

• **BAGene RH-TYPE, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygosity-TYPE, RHD-TYPE Asia**

14. **Chérif-Zahar B**, Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3 – 1p36.1 by in situ hybridisation. *Hum Genet* 1991;86: 398-400
15. **Blunt T**, Daniels G, Carritt B: Serotype switching in a partially deleted *RHD* gene. *Vox Sang* 1994;67:397-401
16. **Rouillac C**, Colin Y, Hughes-Jones NC, et al.: Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood* 1995;85:2937-2944
17. **Rouillac C**, Le Van Kim C, Beolet M, Cartron J-P, Colin Y: Leu110Pro substitution in the RhD polypeptide is responsible for the DVII category blood group phenotype. *Am J Hematol.* 1995;49:87-88
18. **Mouro I**, Colin Y, Sistonen P, Le Pennec PY, Cartron J-P, Le Van Kim C: Molecular basis of the RhC^w (Rh8) and RhC^x (Rh9) blood group specificities. *Blood* 1995;86:1196-1201
19. **Beckers EAM**, Faas BHW, Simsek S, et al.: The genetic basis of a new partial D antigen: D^{DBT}. *Br J Haematol.* 1996;93:720-727
20. **Gassner C**, et al.: RHD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers *Transfusion* 1997;37:1020-1026.

21. **Okada H**, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, Okubo Y, Kajii E: The *RHD* gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. *J Clin Invest* 1997;100:373-379
22. **Wagner FF**, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA: Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features. *Blood* 1998;91:2157-2168
23. **Legler TJ**, Maas JH, Blaschke M, Malekan H, Ohto R, Lynen R, Bustami N, Schwartz DWM, Mayr WR, Köhler M, Panzer S: *RHD* genotyping in weak D phenotypes by multiple polymerase chain reactions. *Transfusion* 1998;38:434-440
24. **Omi T**, Takahashi J, Tsudo N, et al.: The genomic organization of the partial D category DVa : the presence of a new partial D associated with the DVa phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254:786-794
25. **Wagner FF**, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA: Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385-93.
26. **Flegel WA**, Wagner FF: Molecular genetics of *RH*. *Vox Sang* 2000;78 (suppl 2): 109-115
27. **Wagner FF**, Flegel WA: *RHD* gene deletion occurred in the *Rhesus box*. *Blood* 2000;95:3662-3668
28. **Avent ND**, Reid ME: The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:375-387
29. **Legler TJ**, Wiemann V, Ohto H, Matuda I, Obara T, Uchikawa M, Köhler M: D^{Va} Category Phenotype and Genotype in Japanese Families. *Vox Sang* 2000;78:194-197
30. **Wagner T**, Resch B, Legler TJ, Mossier C, Helmberg W, Köhler, M, Lanzer G: Severe HDN due to anti-Ce that required exchange transfusion. *Transfusion* 2000;40:571-574
31. **Wagner FF**, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher Ni, Lonicer CB, Muller TH, Siegel MH, Flegel WA: Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood* 2000;95:2699-708.
32. **Singleton BK**, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G: The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD-negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12-18
33. **Wagner FF**, Fromajer A, Flegel WA: *RHD* positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics* (2001)2:10
34. **Müller TH**, Hallensleben M, Schunter F, Blasczyk R: Molekulargenetische Blut-gruppendiagnostik. *Dt Arztebl* 2001;98:A 317-322 [Heft 6]
35. **Shao CP**, Maas JH, Su YQ, Köhler M, Legler TJ: Molecular background of RhD-positive, D-negative, Del and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang* 2002;83:156-161
36. **Wagner FF**, Eicher NI, Jørgensen JR, Lonicer CB, Flegel WA: DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. *Blood* 2002;100:2253-6
37. **Wagner FF**, Ladewig B, Angert KS, Heymann GA, Eicher NI, Flegel WA: The *DAU* allele cluster of the *RHD* gene. *Blood* 2002;100:306-11
38. **Perco P**, Shao CP, Mayr WR, Panzer S, Legler TJ: Testing for the D zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion* 2003;43:335-339

- **BAGene KKD-TYPE**

39. **Lee S**, Naime DS, Reid ME, Redman CM: Molecular basis for the high-incidence antigens of the Kell blood group system. *Transfusion* 37:1117, 1997
40. **Lee S**, Wu X, Reid M, Zelinski T, Redman C: Molecular basis of the Kell (K1) phenotype. *Blood* 85:912, 1995
41. **Olives B**, Neau P, Bailly P, Hediger MA, Rousselet G, Cartron JP, Ripoche P: Cloning and functional expression of a urea transporter from human bone marrow cells. *J.Biol.Chem.* 269:31649, 1994
42. **Lucien N**, Sidoux-Walter F, Olives B, Moulds J, Le Pennec PY, Cartron JP, Bailly P: Characterization of the gene encoding the human Kidd blood group/urea transporter protein. Evidence for splice site mutations in Jknull individuals. *J.Biol.Chem.* 273:12973, 1998

43. **Cartron JP**, Ripoche P: Urea transport and Kidd blood groups. *Transfus.Clin.Biol.* 2:309, 1995
44. **Olives B**, Merriman M, Bailly P, Bain S, Barnett A, Todd J, Cartron JP, Merriman T: The molecular basis of the Kidd blood group polymorphism and its lack of association with type 1 diabetes susceptibility. *Hum.Mol.Genet.* 6:1017, 1997
45. **Neote K**, Mak JY, Kolakowski LFJ, Schall TJ: Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 84:44, 1994
46. **Chitnis CE**, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH: The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J.Exp.Med.* 184:1531, 1996
47. **Chaudhuri A**, Zbrzezna V, Polyakova J, Pogo AO, Hesselgesser J, Horuk R: Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J.Biol.Chem.* 269:7835, 1994
48. **Chaudhuri A**, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO: Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:10793, 1993
49. **Tournamille C**, Le van Kim C, Gane P, Cartron JP, Colin Y: Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. *Hum.Genet.* 95:407, 1995
50. **Iwamoto S**, Omi T, Kajii E, Ikemoto S: Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44- amino acid residue. *Blood* 85:622, 1995
51. **Chaudhuri A**, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo AO: The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy- negative individuals. *Blood* 85:615, 1995
52. **Mallinson G**, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ: Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br.J.Haematol.* 90:823, 1995
53. **Tournamille C**, Colin Y, Cartron JP, Le van Kim C: Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat.Genet.* 10:224, 1995
54. **Tournamille C**, Le van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, Cartron JP, Colin Y: Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals. *Blood* 92:2147, 1998
55. **Miller SA**, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic.Acids.Res.* 16:1215, 1988
56. **Rožman P**, Dovč T, Gassner C: Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion Volume* 40, August 2000, 936-942

- **BAGene MNS-TYPE**

57. **Landsteiner K**, Levine P: A new agglutinable factor differentiating individual human bloods, *Proc. Soc. exp. Biol.* 24, 600 (1927)
58. **Walsh RJ**, Montgomery C: A new human isoagglutinin subdividing the MN blood groups. *Nature* 160, 504 (1947)
59. **Shih MC**, Yang LH, Wang NM, Chang JG: genomic typing of human red cell Miltenberger glycoporphins in a Taiwanese population. *Transfusion* 2000; 40: 54-61
60. **Storry JR**, Reid ME, Fetics S, Huang CH: Mutations in *GYPB* exon 5 drive the S-s-U^{var} phenotype in persons of African descent: implications for transfusion. *Transfusion* 2003; 43: 1738-1747

- **BAGene HPA-TYPE**







61. **Ballem PJ**, Buskard NA, Decary F, et al.: Post-transfusion purpura secondary to passive transfer of anti-PI^{A1} by blood transfusion. Br J Hematol 1987;66:113-4
62. **Mueller-Eckhardt C**, Kiefel V, Grubert A, et al.: 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. Lancet 1989;1:363-6.
63. **Panzer S**, Kiefel V, Bartram CR, et al.: Immune thrombocytopenia more than a year after allogeneic marrow transplantation due to antibodies against donor platelets with anti- PI^{A1} specificity: evidence for a host derived immune reaction. Br J Hematol 1989;71:259-64
64. **Mueller-Eckhardt C**, Kiefel V, Santoso S: Review and update of platelet alloantigen systems. Transfus Med Rev 1990;4:98-109
65. **Santoso S**, Kiefel V: Human platelet specific alloantigens: update. Vox Sang 1998;74 (Suppl):249-53
66. **Jau-Yi L**, Ying-Ju C, Hui-Yu H, Jeong-Shi L, Cheng-Hwai T: PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w Transfusion Volume 42, August 2002,1089-1095

- **BAGene HNA-TYPE**

67. **Carl B**, Kroll H, Bux J, Bein G, Santoso S: B-lymphoblastoid cell lines as a source of reference DNA for human platelet and neutrophil antigen genotyping. Transfusion 2000;40:62-68.
68. **Sachs UJH**, Chavakis T, Fung L, Lohrenz A, Bux J, Reil A, Ruf A, Santoso S: Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1-dependent leukocyte adhesion. Blood 2004;104,3:727-34.
69. **Sachs UJH**, Reil A, Bauer C, Bux J, Bein G, Santoso S: Genotyping of human neutrophil antigen-5a (Ond). Transfus Med 2005;15:115-117.

- **obecné**

70. **Maniatis et al.**, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
71. **Beutler E et al.**, 1990. BioTechniques 9:166
72. **Olerup O**, Zetterquist H, 1992. Tissue Antigens 39:225-235
73. **Olerup O**, Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens 41:55-56
74. **Chen EY**, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinis RE, Seeburg PH. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. Genomics 4:479, 1989.

8. Vysvětlení symbolů	
	in vitro diagnosticum –pro in vitro diagnostiku
	číslo šarže
	katalogové číslo
	teplota skladování
	použijte do
	čtěte návod k použití

Verze platná k 05/2009

**BAG Health Care GmbH,
Na Hlínách 17, 182 00 Praha 8,
tel.: 286 840 508, fax: 286 840 510
E-mail : info@bag-healthcare.cz
www.bag-healthcare.cz**