

FR

Notice utilisateur

Trousses BAGene SSP

Consulter la version électronique de la notice utilisateur sur www.bag-diagnostics.com




Trousses de test pour la détermination des groupes sanguins ABO, des types RH, des systèmes Kell, Kidd et Duffy, du système MNS, des systèmes de groupes sanguins rares, des spécificités HPA et HNA par méthode de génétique moléculaire

prêt à l'emploi, pré-aliquoté

Lire attentivement les instructions figurant dans le manuel d'utilisation du ou des système(s) et sur les étiquetages, et/ou dans la notice d'utilisation du réactif.

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

Table des matières

1. Description du produit	2
2. Matériel	2
2.1. Contenu des trousse BAGene	2
2.2. Matériel requis mais non fourni	3
2.3. Conservation et stabilité	3
3. Données de performance	3
4. Procédure de test	4
4.1. Conditions de sécurité et remarques spécifiques	4
4.2. Isolement de l'ADN	4
4.3. Amplification	4
4.4. Électrophorèse sur gel	6
4.5. Documentation	6
4.6. Interprétation des résultats et limites de la méthode	7
4.6.1. Généralités	7
4.6.2. ABO-TYPE et ABO-TYPE variant	7
4.6.3. RH-TYPE	8
4.6.4. Partial D-TYPE	9
5. Mises en garde spéciales et précautions d'emploi,	9
6. Dépannage	10
7. Bibliographie	10
8. Explication des symboles utilisés sur les emballages	11

Distribué en Belgique, en France, au Luxembourg et en Suisse romande par :

médiane diagnostics Z.A. de la Chaîne 78370 PLAISIR +33 1.30.07.50.60 info@mediane-diag.fr

Version : 14/2019 / édition : 2019-06

1. Description du produit

Les tests BAGene doivent être réalisés par des techniciens de laboratoire bien formés et autorisés. Les trousseaux sont utilisés pour déterminer les spécificités des groupes sanguins des donneurs, des receveurs et des femmes enceintes par technique de biologie moléculaire. Les trousseaux ABO-, ABO variant-, RH- (comprend le caractère D Zygosity), Partial D-, Weak D-, et KKD-TYPE permettent de compléter, d'expliquer et de confirmer les résultats de sérologie. Les trousseaux MNS-, HPA-, HNA- et Rare-TYPE peuvent être utilisés pour le génotypage sans recourir aux tests sérologiques, sauf mention contraire éventuelle (consulter les réglementations nationales).

L'ADN leucocytaire purifié constitue le matériau de base du typage par les trousseaux BAGene. Le test est réalisé en technique PCR-SSP (PCR par amorces spécifiques de séquence ou *Sequence Specific Primers*) (voir figure 1). Cette méthode est basée sur le fait que l'extension de l'amorce, et ainsi la réussite de la PCR repose sur l'appariement parfait de l'extrémité 3' des deux amorces. Par conséquent, l'amplification est obtenue uniquement si les amorces correspondent en totalité à la séquence cible. Le produit de l'amplification est ensuite visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose.

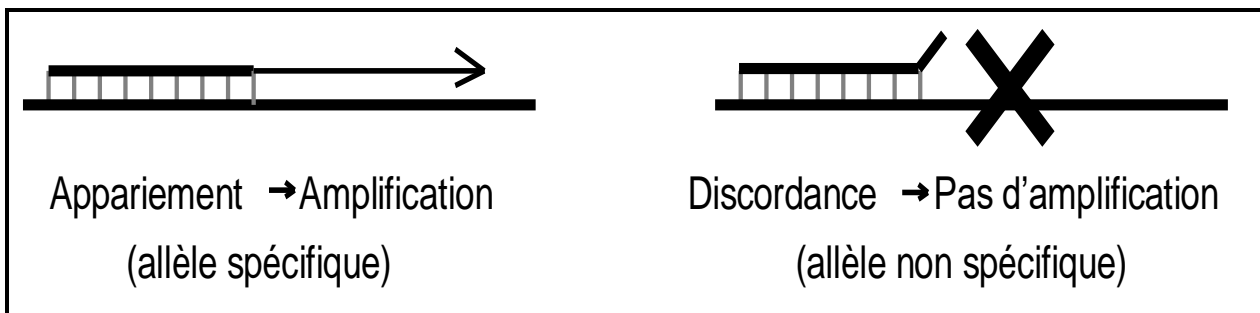


Figure 1 Principe de la PCR-SSP

La composition de chaque mélange d'amorces permet l'identification claire des génotypes ABO, RH, KEL, JK, FY, MNS, des groupes sanguins rares, HPA et HNA indiqués dans les diagrammes d'évaluation respectifs. Un certain nombre de mélanges réactionnels pré-aliquotés est utilisé pour chaque typage. Un contrôle interne de l'amplification est présent dans chaque mélange réactionnel.

2. Matériel

2.1. Contenu des trousseaux BAGene

- ◆ Plaques/barrettes PCR pour le génotypage du groupe sanguin. Les mélanges réactionnels pré-aliquotés et séchés sont composés d'amorces spécifiques d'allèle, d'amorces de contrôle interne, spécifique du gène HGH (Human Growth Hormone), ou d'une séquence du chromosome I (de 90 kpb à l'extrémité 5' de la boîte Rhésus) et de nucléotides. Le mélange réactionnel n° 1 est indiqué par un repère. Le numéro du lot est imprimé sur chaque plaque/barrette.
- ◆ Tampon PCR 10x
- ◆ 8 bouchons de barrette
- ◆ 1 CD (disque compact) qui renferme la Notice utilisateur, la Fiche de résultats (*worksheet*) et le Certificat de CQ (contrôle de qualité)

2.2. Matériel requis mais non fourni

- ◆ Happy Taq (RÉF 70976) (ou une autre Taq polymérase validée avec les trousse BAGene par l'utilisateur).
L'enzyme Happy Taq est fournie gratuitement avec la commande d'une trousse BAGene.
Ne pas utiliser de Taq polymérase « hot start » (ex. : Ampli Taq Gold)
- ◆ Trousse **EXTRA-GENE I** (RÉF 7059) (facultative) pour l'extraction d'ADN à partir de sang, lymphocytes ou leucocytes, ou matériel pour d'autres méthodes d'extraction d'ADN
- ◆ Pipettes à piston (0,5 à 250 µl)
- ◆ Embouts stériles avec filtre intégré
- ◆ Thermocycleur (voir page 6 la liste des thermocycleurs validés)
- ◆ Agarose ADN
- ◆ Tampon TBE 0,5x (Tris 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 0,5 mM)
- ◆ Bromure d'éthidium (EtBr)
- ◆ Appareil d'électrophorèse à gel immergé.
- ◆ Générateur électrique (200 à 300 V, 200 mA)
- ◆ Échelle ADN (RÉF 7097)
- ◆ Source d'UV (transilluminateur, 220 à 310 nm)
- ◆ Système de documentation du gel

2.3. Conservation et stabilité

Les trousse BAGene sont livrées à température ambiante. La trousse Happy Taq est expédiée dans de la glace carbonique. Conserver tous les réactifs à une température ≤ -20 °C après réception. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de chaque réactif. Elle est également valable une fois les réactifs ouverts. La date de péremption indiquée sur l'étiquette externe correspond au réactif ayant la validité la plus courte dans la trousse. Décongeler le tampon PCR 10x peu de temps avant utilisation.

3. Données de performance

La composition du mélange d'amorces garantit une identification fiable des allèles mentionnés sur le diagramme d'évaluation, d'après les données de séquences connues à l'heure actuelle. L'exactitude et la reproductibilité de la spécificité de chaque mélange d'amorces ont été vérifiées pour chaque lot à l'aide d'échantillons d'ADN de contrôle aux spécificités connues. Les allèles, qui ne sont pas inclus et qui ne sont pas testés à l'heure actuelle en raison de leur rareté, sont indiqués sur le diagramme d'évaluation (nt = non testé à l'heure actuelle).

Toutes les trousse BAGene ont fait l'objet d'études de performance sur des échantillons d'ADN déjà typés. La réaction positive de certains mélanges n'a pas pu être testée car celle-ci est spécifique d'allèles rares non disponibles pour l'analyse. Ceux-ci sont indiqués sur la Fiche de résultats (worksheet) ou sur le tableau de spécificité. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec d'autres trousse SSP de groupage sanguin et à des méthodes d'analyse des groupes sanguins par sérologie ou par séquençage. Les résultats de typage ont montré une concordance à 100 % avec les résultats de pré-typage.

L'évaluation et le contrôle qualité des mélanges ont été réalisés à l'aide d'échantillons d'ADN, extraits par les trousse EXTRA GENE I (méthode de relargage) ou par les trousse Qiagen QIAamp DNA Blood Mini et Maxi (méthode de colonne). En cas d'utilisation d'une autre trousse d'extraction de l'ADN, l'utilisateur doit valider l'adéquation de l'ADN extrait pour l'application avec les trousse BAGene.

Les trousse BAGene ont été validées avec l'enzyme Happy Taq (RÉF 70976). En cas d'utilisation d'une autre Taq polymérase, l'utilisateur doit valider l'enzyme avec les trousse BAGene. Un typage fiable est garanti à condition d'utiliser 50 à 100 ng d'ADN par mélange réactionnel.

4. Procédure de test

4.1. Conditions de sécurité et remarques spécifiques

La PCR est une méthode particulièrement sensible qui doit être réalisée par du personnel compétent expérimenté dans les techniques de biologie moléculaire et dans les groupages sanguins. Les recommandations les plus récentes de médecine transfusionnelle et pour la détermination des groupes sanguins ainsi que d'anamnèse de la transfusion doivent être prises en compte afin de réduire le risque de typages erronés, en particulier en cas de résultats discordants entre les méthodes d'analyse sérologique et moléculaire. Le génotypage des spécificités ABO, RHD/RHCE, Kell, Kidd et Duffy doit être réalisé après l'épreuve sérologique.

Des précautions particulières de sécurité doivent être prises pour éviter la contamination et donc les fausses réactions.

- ◆ Porter des gants pour manipuler (sans poudre si possible).
- ◆ Utiliser de nouveaux embouts à chaque étape de pipetage (avec un filtre intégré).
- ◆ Utiliser des zones de travail séparées pour les tâches avant l'amplification (isolement de l'ADN et préparation des réactions) et après l'amplification (électrophorèse sur gel, documentation). De préférence, utiliser deux pièces différentes.
- ◆ Utiliser les dispositifs et autres matériels uniquement à leur place respective et veiller à ce qu'ils ne puissent pas être échangés.

4.2. Isolement de l'ADN

L'échantillon pour l'isolement d'ADN génomique doit être prélevé dans des dispositifs adaptés au recueil du sang. La présence d'héparine peut inhiber la PCR. Par conséquent, les dispositifs de recueil de sang contenant de l'héparine ne sont pas adaptés [2]. Il est recommandé d'utiliser du sang recueilli sur EDTA ou sur citrate pour le génotypage.

Méthodes validées pour l'extraction de l'ADN :

- EXTRA GENE I (BAG Healthcare)
- Trousses QIAamp DNA Blood Mini et Maxi (QIAGEN)

La méthode utilisée par le laboratoire pour l'isolement de l'ADN doit être validée par l'utilisateur.

Les indices de pureté de l'ADN doivent être les suivants :

- $DO_{260}/DO_{280} = > 1,5 \text{ et } < 2,0$ (indicateur d'une contamination par ARN/protéines)
- $DO_{260}/DO_{230} = > 1,8$ (indicateur d'une contamination par des sels, des glucides ou des solvants organiques)

4.3. Amplification

Tous les mélanges réactionnels pré-aliquotés contiennent déjà les amorces spécifiques d'allèle et de contrôle, ainsi que les nucléotides. Ceux-ci sont livrés séchés dans la cupule réactionnelle. Les paramètres de l'amplification sont optimisés pour obtenir un volume final de 10 µl.

1. Sortir le nombre nécessaire de plaques/barrettes du congélateur à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et décongeler le tampon PCR 10x.
2. Pipeter le mélange initial composé de tampon PCR 10x, de solution d'ADN, de Taq polymérase et d'eau distillée et bien homogénéiser. Les différentes trousses BAGene utilisent toutes le même mélange initial et peuvent de ce fait être combinées. La composition du mélange initial est indiquée dans le tableau 1.

Tableau 1 Composition du mélange initial selon le nombre de mélanges réactionnels

Mélanges (Nombres)	Eau distil.	Tampon PCR 10x	Solution d'ADN (50 à 100 ng/μl)	Happy Taq (5 U/μl)	Volume total
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

N.B. Pour des concentrations en ADN différentes, les quantités de solution d'ADN et d'eau doivent varier en conséquence (p. ex. pour 12 mélanges : 5,8 μl de solution d'ADN (120 ng/μl) et 119 μl d'eau distillée).

En cas d'utilisation d'une autre Taq polymérase, l'utilisateur doit valider l'enzyme utilisée avec les trousse BAGene.

Il est recommandé de préparer au minimum le mélange initial nécessaire pour 6 mélanges réactionnels en raison du faible volume de Taq-polymérase

3. Homogénéiser au vortex et distribuer immédiatement 10 μl de ce mélange dans les cupules réactionnelles pré-aliquotées et séchées. Changer d'embout après chaque étape de distribution. Bien fermer les tubes avec les bouchons respectifs. S'assurer de ne pas toucher la paroi interne des bouchons ni les bords supérieurs des tubes avec les doigts pour éviter les contaminations. Si le thermocycleur est équipé d'un capot à fermeture hermétique, il est également possible d'utiliser des tapis de silicone réutilisables. Agiter légèrement la plaque vers le bas pour dissoudre le résidu situé au fond de la plaque. Toute la solution PCR doit se déposer au fond de la cupule.

4. Placer les tubes réactionnels dans le thermocycleur et bien serrer le couvercle pour que les cupules réactionnelles ne se déforment pas à la chaleur. Lancer le programme PCR. Il n'est pas nécessaire de recouvrir les mélanges réactionnels avec de l'huile minérale en présence d'un couvercle chauffant et ajusté.

Repère →	N° LOT	
N° de mix →	①	⑨
	②	⑩
	③	.
	④	.
	⑤	.
	⑥	.
	⑦	.
	⑧	.

Paramètres d'amplification pour toutes les trousse BAGene

Étape	Durée	T°	Nb de cycles
Première dénaturation	5 mn	96 °C	1 cycle
Dénaturation	10 s	96 °C	5 cycles
Hybridation + extension	60 s	70 °C	
Dénaturation	10 s	96 °C	10 cycles
Hybridation	50 s	65 °C	
Extension	45 s	72 °C	
Dénaturation	10 s	96 °C	15 cycles
Hybridation	50 s	61 °C	
Extension	45 s	72 °C	
Extension finale	5 mn	72 °C	1 cycle

Thermocycleurs validés

PTC 200 / C1000
(MJ Research/ BioRad)

GeneAmp PCR 9700
(ABI)

N.B.: utiliser la vitesse de montée en température du modèle 9600

Veriti
(ABI)

Mastercycler epGradient S
(Eppendorf)

N.B.: utiliser la fonction « *Simuler le gradient Mastercycler* »

Tprofessional (Biometra)

Ne pas utiliser de bloc chauffant en **aluminium** (p. ex., système GeneAmp PCR 9700)

Si la vitesse de montée et descente en température du thermocycleur est très rapide, il est recommandé d'utiliser une vitesse plus lente (~ 2,5 °C/s)

Commentaire : comme les thermocycleurs de différents fabricants fonctionnent différemment, et même des appareils individuels d'un même type peuvent être étalonnés différemment, **il peut être nécessaire d'optimiser les paramètres d'amplification.**

Pour optimiser l'appareil, utiliser les consignes suivantes :

En cas de résultats **faussement positifs** (bandes non spécifiques, types supplémentaires) : augmenter la température d'hybridation par pas de 1 °C.

En cas de résultats **faussement négatifs** (bandes et/ou ctrl. d'amplification manquants) : réduire la température d'hybridation par pas de 1 °C et/ou augmenter les durées d'hybridation par pas de 5 secondes et/ou augmenter les durées de dénaturation par pas de 5 secondes.

Conseil : il est recommandé d'utiliser uniquement des thermocycleurs régulièrement étalonnés. Pour vérifier le thermocycleur, utiliser la trousse **CYCLER CHECK**, **RÉF 7104, 71044**

4.4. Électrophorèse sur gel

La séparation des produits d'amplification est réalisée par électrophorèse sur un gel d'agarose horizontal. Le tampon d'électrophorèse recommandé est le TBE 0,5x (Tris 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 0,5 mM). Le gel doit contenir une concentration de 2,0 à 2,5 % d'agarose. Laisser le gel polymériser pendant au moins 30 minutes avant de déposer les échantillons.

Une fois l'amplification terminée, sortir les échantillons du thermocycleur et déposer la totalité des mélanges réactionnels sur chaque position du gel. Ajouter en plus 10 µl de l'échelle ADN pour la comparaison des tailles. Réaliser la séparation par électrophorèse à 10 à 12 V/cm (avec une distance de 20 cm entre les électrodes, soit environ 200 à 240 V) pendant 20 à 40 minutes. Une fois l'électrophorèse terminée, colorer le gel complet dans une solution de bromure d'éthidium (EtBr) (environ 0,5 µg/ml d'EtBr dans de l'eau ou du tampon TBE). Il est également possible d'ajouter l'EtBr (0,5 µg/ml) au tampon d'électrophorèse ou au gel d'agarose. Au besoin, l'excès d'EtBr peut être éliminé en immergeant le gel dans de l'eau pendant 20 à 30 minutes.

4.5. Documentation

Pour la documentation, visualiser l'amplification PCR à l'aide d'un transilluminateur UV (220 à 310 nm) et le photographier avec un système adapté de documentation de gel. Choisir le temps d'exposition et l'ouverture pour que les bandes soient bien nettes et se détachent du fond sombre (données approximatives : ouverture 11, temps d'exposition 1 seconde). Documenter les résultats sur le diagramme d'évaluation fourni (voir point 4.6).

4.6. Interprétation des résultats et limites de la méthode

4.6.1. Généralités

Documenter les résultats obtenus avec les trousse BAGene sur les Fiches de résultats (*worksheet*) fournies. Celles-ci répertorient les caractéristiques, les spécificités, les phénotypes et les génotypes dans un tableau, et un exemple de schéma de réaction aide à l'interprétation. Les préparations PCR disposent chacune d'un numéro de réaction (p. ex., ABO-TYPE, réactions n°1 à 8). La longueur des fragments de produits PCR spécifiques est indiquée en *pb* sous les numéros des réactions sur la *worksheet*. Les schémas de bandes possibles sont présentés dans les lignes sous le diagramme. Des produits PCR spécifiques (réaction positive) sont indiqués par le signe **+** et les cases correspondantes ont un fond coloré. ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, Rare-TYPE, HPA-TYPE et HNA-TYPE sont surlignés en **gris**, le RH-TYPE supplémentaire en **rouge, vert et bleu**. Les schémas réactionnels sont évalués sur les lignes de gauche à droite.

Seules les bandes d'une taille conforme par rapport à l'échelle ADN doivent être considérées positives. Les tailles conformes des amplicons spécifiques sont indiquées sur la *worksheet*. Pour toutes les pistes sans amplification spécifique d'allèle, le contrôle interne doit systématiquement apparaître à **434 pb**, à l'exception de la réaction PCR du **mélange n° 2 de la trousse RH-TYPE** qui doit apparaître à **659 pb**. Dans la plupart des pistes avec une amplification spécifique d'allèle, le contrôle interne est plus faible ou disparaît complètement. En l'absence de bande spécifique et de bande de contrôle interne, le résultat du mélange correspondant ne peut pas être déterminé.

En cas de résultats incorrects, consulter le guide de dépannage (paragraphe 6).

S'il n'est pas possible d'obtenir des résultats nets avec les trousse BAGene (p. ex., en raison d'allèles inconnus ne pouvant pas être détectés par les amorces existantes), les recommandations nationales de transfusion doivent être respectées conformément aux typages sérologiques obtenus. Le séquençage de ces échantillons est recommandé. Les résultats de typage doivent être interprétés en tenant compte de la variabilité génétique dans les différents groupes ethniques. En cas de doute, le phénotype fait autorité.

4.6.2. ABO-TYPE et ABO-TYPE variant

L'expression homozygote des allèles *ABO*O01*, *ABO*O03*, *ABO*B101*, *ABO*A201* est indiquée au moyen de bandes dans la réaction PCR correspondante (1, 3, 5 ou 7). Dans le cas d'une hétérozygotie, les quatre « non-réactions » doivent présenter une bande dans le gel (2, 4, 6 et 8) en plus de deux préparations PCR spécifiques (1, 3, 5, 7). L'homozygotie de l'allèle *ABO*A101* est indiquée par la présence de bandes uniquement dans les quatre « non-réactions » (2, 4, 6, 8), car il n'existe pas de préparation spécifique *ABO*A101*. La constellation hétérozygote *ABO*A101* peut être reconnue par une bande supplémentaire des réactions spécifiques d'allèle (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16).

Comme seuls certains variants d'allèle *A* peuvent être détectés avec la trousse ABO-TYPE variant, d'autres variants d'allèle *A* peuvent être masqués derrière le résultat PCR ***ABO*A101***. Comme seuls certains variants d'allèle *B* et aucun variant d'allèle *A²* sont détectés avec la trousse ABO-TYPE variant, d'autres variants d'allèle *B* ou *A²* peuvent être masqués derrière les résultats PCR respectivement ***ABO*B101*** et ***ABO*A201***. La plupart des allèles *B^(A)* et *cis AB* présentent également un résultat positif à la réaction *ABO*B101*.

Une bande spécifique de l'hormone HGH, fragment de 434 pb apparaît comme contrôle interne.

Veuillez consulter les remarques particulières sur la Fiche de résultats (*worksheet*) des trousse ABO-TYPE et ABO-TYPE *variant*.



4.6.3. RH-TYPE

La détermination par technique de biologie moléculaire du *RHD* standard ainsi que de certains variants *RHD* (haplotypes *RHD* positifs dans des échantillons D négatifs en sérologie, D partiel, D_{del}) et du caractère de zygosité D sont réalisés dans les réactions PCR désignées.



Les préparations 1 et 2 sont des réactions PCR multiplexes qui examinent 5 polymorphismes *RHD* (intron *RHD* 4 et 7, exon 7) ainsi que la détection spécifique de l'allèle *RHD*01N.08* (W16X) et de l'allèle *RHD*08N.1* (Ψ). Ceci signifie que contrairement à toutes les autres trousse BAGene (sauf pour la bande de contrôle interne), chaque réaction PCR doit produire non pas un mais deux amplicons spécifiques. Pour faciliter l'évaluation, les cases respectives sont divisées et présentent un fond bicolore quand deux bandes peuvent apparaître. Les longueurs de fragment du produit PCR et les polymorphismes sont également identifiés par une couleur spécifique selon les cases pour le schéma réactionnel.

Exemple *RHD*01.08* (Ψ) :

Préparation n°1 : deux bandes spécifiques doivent être présentes dans le gel.

- Produit PCR **224 pb**, identification **grise**, schéma réactionnel  dans la case avec un fond **gris**
- Produit PCR **123 pb**, identification **bleue**, schéma réactionnel  dans la case avec un fond **bleu**

Préparation n°2 : deux bandes spécifiques doivent être présentes dans le gel.

- Produit PCR **154 pb**, identification **verte**, schéma réactionnel  dans la case avec un fond **vert**
- Produit PCR **390 pb**, identification **grise**, schéma réactionnel  dans la case avec un fond **gris**

Les réactions PCR désignées sont destinées à la détermination en génétique moléculaire des caractéristiques du locus du gène *RHCE*. Une bande spécifique de l'hormone HGH d'une longueur de 434 pb apparaît comme contrôle interne. La réaction PCR n°2 est une exception : ici, la bande de contrôle apparaît à 659 pb (spécifique de la séquence génomique du chromosome I de 90 kpb à l'extrémité 5' de la *boîte Rhésus*).

Si le schéma réactionnel indique la présence d'un variant *RHD*, un test complémentaire doit être réalisé à l'aide de la trousse **Partial D-TYPE** pour exclure des mutations SNP pouvant être la cause de réactivités observées.

D Zygoty

La trousse RH-TYPE permet également de déterminer la zygoté *RHD*, soit DD, Dd ou encore dd. Pour cela la présence/ l'absence de la *boîte Rhésus* en amont (U_{Box}) est testé à l'aide du mélange n° 10, et le mélange n° 11 permet d'évaluer la situation concernant la boîte Rhésus hybride (H_{Box}). Pour les allèles *RHD* ne pouvant pas être déterminés par sérologie (RhD négatifs), une discordance peut apparaître entre le résultat sérologique et le génotypage. La détection de la boîte *Rhésus* situé en aval indique la présence d'un allèle *RHD* (*RHD* positif), excepté pour l'allèle *RHD*08N.01* (Ψ), présent sous forme homozygote ou hémizyote. La bande du mélange n° 10 peut alors être négative malgré la présence d'un allèle *RHD*.

Ce même mélange peut également être faussement négatif en présence d'une *boîte Rhésus* (U_{Box}) modifiée génétiquement (ex. weak-D 4.2 (DAR 1)), tout en observant pour cet échantillon un résultat sérologique D positif. Pour vérifier ce type de résultat contradictoire la trousse RH-TYPE contient deux mélanges qui détectent spécifiquement l'allèle *RHD*08N.01* (Ψ) et l'allèle weak-D 4.2 (DAR 1). Ainsi, pour un résultat sérologique D positif en présence et d'une PCR positive pour la *boîte Rhésus* hybride, le résultat est « Dd ». Dans le cas contraire, avec une PCR négative pour la *boîte Rhésus* hybride, le résultat est « DD ».

Cependant, en raison d'un polymorphisme distinct de la *boîte Rhésus* hybride des Africains, le résultat peut être faussement positif en présence de l'allèle *RHD*08N.01* (Ψ) et d'un autre allèle *RHD*.

Il est rappelé ici que la présence d'autres allèles *RHD* négatifs ne peut pas être exclue avec ces trousses dans leur configuration actuelle. Ceci fait doit être pris en compte dans l'interprétation des résultats obtenus. Cependant, l'incidence de ces allèles dans la population blanche est très faible.

Autre rappel, l'ADN dégradé peut conduire à des résultats faussement négatifs. Ceci se manifeste par la seule présence de bandes de contrôle interne ou l'observation d'aucune bande.

4.6.4. Partial D-TYPE

Une absence de bande la réaction n°4 peut indiquer un DFR (faiblement positif avec l'anti-D en sérologie) ou un *RHD*08N.01* (Ψ) (hémi- ou homozygote, D négatif en sérologie). En l'absence d'information sérologique, la confirmation ou l'exclusion du *RHD*08N.01* (Ψ) peut être obtenue à l'aide de trousse RH-TYPE. En présence d'un *RHD*weak* D-type 41 (*RHD*01W.41*) et/ou d'un *RHD*weak* D-type 45 (*RHD*01W.45*) le mélange n°9 peut présenter une absence de réaction. Des mutations dans les introns peuvent également conduire à une réaction manquante dans les mélanges 8 ou 9. En présence d'un *RHD*weak* D-type 20 (*RHD*01W.20*), le mélange n° 10 ne présente normalement pas de bande, mais une bande faible peut parfois apparaître.

Une différenciation par technique de biologie moléculaire des variants de D *RHD*DCS*, **DFW*, **DIM* et **DNU* du *RHD* standard n'est pas possible à l'heure actuelle. La prise en compte des haplotypes est utile.

5. Mises en garde spéciales et précautions d'emploi,

Le bromure d'éthidium est un agent mutagène puissant. Éviter les contaminations et le contact avec la peau. Consulter la notice utilisateur et les avertissements et précautions du fabricant.

Le transilluminateur émet une lumière UV à longueur d'onde très courte qui peut provoquer des brûlures de la peau et de la rétine. Utiliser un masque facial anti-UV.

Les produits biologiques utilisés pour l'extraction de l'ADN, par exemple le sang ou un tissu humain, doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses. Il est donc recommandé de respecter les précautions de sécurité adaptées pour manipuler les produits biologiques (ne pas pipeter à la bouche, utiliser des gants jetables pour manipuler les produits biologiques et réaliser le test, se désinfecter les mains une fois le test terminé).

Les déchets biologiques doivent être inactivés avant leur élimination (p. ex., au moyen d'un autoclave). Les produits jetables doivent être autoclavés ou incinérés après usage.

Un renversement de produits potentiellement infectieux doit être ramassé immédiatement avec du papier absorbant, et les zones contaminées doivent être nettoyées avec un désinfectant standard adapté ou avec de l'alcool à 70 %. Les matériels utilisés pour nettoyer les renversements, y compris les gants, doivent être inactivés avant leur élimination (p. ex., au moyen d'un autoclave).

L'élimination de tous les échantillons, des réactifs non utilisés et des déchets doit respecter les réglementations nationales, régionales et locales.

Une déclaration sur les Fiches de Données de Sécurité (FDS) peut être téléchargée à l'adresse www.bag-diagnostics.com.

6. Dépannage

Problème	Raison possible	Solution
Pas d'amplification, échelle ADN visible	ADN contaminé par des inhibiteurs de PCR, ADN dégradé	Réisolé l'ADN, essayer d'autres méthodes
	Concentration en ADN trop élevée ou trop faible	Modifier la concentration en ADN, réisolé l'ADN
	Enzyme absente ou en concentration trop faible	Refaire le typage, modifier la concentration de l'enzyme
	ADN provenant de sang hépariné	Refaire le typage avec du sang recueilli sur EDTA
	Paramètres d'amplification incorrects	Optimiser les paramètres d'amplification (voir chapitre 4.3) ☆
Échec répété sur certaines pistes (pas sur le contrôle d'amplification)	Fuite dans les tubes réactionnels ; perte d'eau et modification de la concentration au cours de la PCR	Fermer hermétiquement les tubes avec leurs bouchons
Amplification non spécifique, bandes supplémentaires (les bandes supplémentaires d'une taille non significative doivent être négligées)	Contamination par d'autres produits d'amplification	Décontaminer, refaire le typage, assurer des conditions de travail propres
	ADN contaminé par des sels	Réisolé l'ADN, essayer d'autres méthodes
	Concentration en ADN trop élevée	Utiliser moins d'ADN
	Concentration en enzyme trop élevée	Utiliser moins d'enzyme
	Paramètres d'amplification incorrects	Optimiser les paramètres d'amplification (voir chapitre 4.3) ☆
Le résultat donne plus de 2 spécificités	Contamination par transfert (produits d'amplification), nouvel allèle	Vérifier les mélanges de typage sans ajouter d'ADN, décontaminer, assurer des conditions de travail propres
Pas de bandes visibles ou bandes très faibles, échelle ADN invisible	Coloration à l'EtBr trop faible	Refaire la coloration
Fond du gel trop clair	Durée de coloration trop longue, concentration en EtBr trop élevée	Tremper le gel dans de l'eau ou du TBE, réduire la concentration en EtBr
Bande floue	Tampon d'électrophorèse trop chaud ou usagé, mauvais tampon d'électrophorèse, polymérisation incomplète du gel	Réduire la tension, utiliser du tampon TBE 0,5x, utiliser un gel entièrement polymérisé






☆ Si l'équipement et les matériels utilisés sont ceux proposés dans cette notice, l'optimisation des paramètres d'amplification ne doit être envisagée qu'en dernier ressort. Dans la plupart des cas, il est possible d'évaluer le test sans tenir compte des bandes supplémentaires de taille variable.

7. Bibliographie

- Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
- Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

Pour obtenir d'autres références, consulter www.baq-diagnostics.com.

8. Explication des symboles utilisés sur les emballages

	Date de péremption
	Température de conservation / Limite inférieure de température
	Consulter la notice utilisateur
	Suffisant pour n tests
	Fabricant
BLOOD TYPING	Destination : détermination du groupe sanguin
CONT	Contenu, contient
HNA TYPING	Destination : détermination des spécificités HNA
HPA TYPING	Destination : détermination des spécificités HPA
BAGene INFORMATION CD	CD (contenant la Notice utilisateur, la Fiche résultat (<i>worksheet</i>) et le Certificat de CQ)
eIFU v.xx/xxxx	Version électronique de la notice utilisateur
IVD	Pour usage de diagnostic <i>in vitro</i>
LOT	N° de sous-lot
PCRBUF 10x	Tampon PCR, concentré 10x
PCRCAP	Bouchons PCR
PCRPLATE	Plaques PCR
PCRSTRIP	Barrettes PCR
REACTIONMIX	Mélanges réactionnels
RÉF	Code produit
RTU	Prêt à l'emploi
TAQ POLYMERASE	Taq polymérase

Pour les notices utilisateur en d'autres langues veuillez consulter <http://www.bag-diagnostics.com> ou contacter nous directement sous info@bag-diagnostics.com ou par téléphone au +49 (0)6404-925-125