

Notice technique d'utilisation  
Trousse **BAGene** DNA-SSP

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

prêts à l'emploi, pré-aliquotés

**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.**

<b>RÉF</b>	<b>6640</b>	<b>ABO-TYPE</b>
<b>RÉF</b>	<b>6641</b>	<b>ABO-TYPE variant</b>
<b>RÉF</b>	<b>6645</b>	<b>RH-TYPE</b>
<b>RÉF</b>	<b>6646</b>	<b>Partial D-TYPE</b>
<b>RÉF</b>	<b>6647</b>	<b>Weak D-TYPE</b>
<b>RÉF</b>	<b>6648</b>	<b>D Zygoty-TYPE</b>
<b>RÉF</b>	<b>6650</b>	<b>KKD-TYPE</b>
<b>RÉF</b>	<b>6652</b>	<b>MNS-TYPE</b>
<b>RÉF</b>	<b>6660</b>	<b>HPA-TYPE</b>
<b>RÉF</b>	<b>66701</b>	<b>HNA-TYPE</b>

**Table des matières**

1.	Description du produit.....	2
2.	Matériel.....	2
2.1.	Contenu des trousse BAGene SSP.....	2
2.2.	Matériel nécessaire mais non fourni.....	2
2.3.	Conservation et stabilité .....	3
3.	Données de performance.....	3
4.	Protocole .....	3
4.1.	Conditions de sécurité et remarques spécifiques .....	3
4.2.	Isolement de l'ADN .....	4
4.3.	Amplification .....	4
4.4.	Électrophorèse sur gel .....	7
4.5.	Documentation .....	7
4.6.	Interprétation des résultats et limites de la méthode .....	7
5.	Avertissements et précautions.....	10
6.	Dépannage .....	11
7.	Bibliographie.....	12
8.	Explication des symboles utilisés .....	12

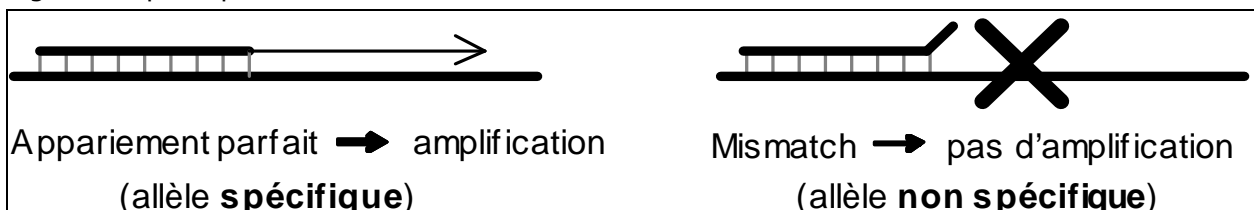
Version 9/14 – Publication : juillet 2014

## 1. Description du produit

Les trousse BAGene sont utilisées pour le génotypage des spécificités ABO, RH, Kell, Kidd, Duffy, MNS, HPA et HNA. Elles complètent, explicitent et confirment les résultats sérologiques et assurent un typage clair des donneurs, des receveurs et des femmes enceintes au niveau de l'ADN.

L'ADN leucocytaire purifié constitue le matériau de base du typage par les trousse BAGene SSP. Le test est réalisé par 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 de ce fait la réussite de la PCR repose sur l'appariement exact de l'extrémité 3' des deux amorces. Par conséquent, l'amplification est obtenue uniquement si les amorces correspondent en totalité à la séquence cible. Elle est ensuite visualisée 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*, *HPA* et *HNA* indiqués dans les diagrammes d'évaluation respectifs. Chaque typage utilise, un certain nombre de mélanges réactionnels **pré-aliquotés**. Un contrôle interne d'amplification est présent dans chaque mélange réactionnel.

## 2. Matériel

### 2.1. Contenu des trousse BAGene SSP

- ◆ Plaques/barrettes PCR pour le typage 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 (90 kpb à l'extrémité 5' de la *boîte rhésus*) et de nucléotides. Le mélange réactionnel n° 1 est indiqué par un marquage. Le numéro du lot est imprimé sur chaque plaque/barrette.
- ◆ Tampon PCR 10x
- ◆ Bouchons de barrette 8x
- ◆ Notice d'utilisation, fiche de travail
- ◆ Informations relatives à l'évaluation (uniquement pour **ABO-TYPE variant**)

### 2.2. Matériel nécessaire mais non fourni

- ◆ Taq Polymerase 5 U/ $\mu$ L, p. ex., HISTO TAQ (RÉF 70975 ou Qiagen Taq), **ne pas utiliser de Taq Polymerase « hot start »** (ex. : Ampli Taq Gold)
- ◆ Trousse **EXTRA-GENE**, 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 (0,5-250  $\mu$ L)

- ◆ Embouts stériles avec filtre intégré
- ◆ Thermocycleur (consulter la liste des thermocycleurs validés **page 7**)
- ◆ 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 (200-300 V, 200 mA)
- ◆ Échelle ADN (**REF** 7097)
- ◆ Source d'UV (transilluminateur, 220-310 nm)
- ◆ Système de documentation du gel

### 2.3. Conservation et stabilité

Les trousse sont livrées à température ambiante. Conserver tous les réactifs à  $\leq -20$  °C. 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 la fiche de travail d'après les données des 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 présentant des spécificités connues. Les allèles qui ne sont pas disponibles et qui n'ont pas été testés en raison de leur rareté sont indiqués sur la fiche de travail (*mention n.t. = non testé à l'heure actuelle*).

Des études de performance ont été réalisées sur toutes les trousse BAGene **SSP** avec des échantillons d'ADN précédemment typés. Ces études ont montré des résultats nets et conformes aux pré-typages sérologiques et/ou génomiques. Aucune discordance n'a été observée au cours des études.

Les échantillons d'ADN utilisés pour l'évaluation et le contrôle de qualité des mélanges ont été extraits à l'aide de trousse **Extra Gene I** (méthode de relargage) ou Qiagen (méthode sur colonne). Les trousse BAGene sont validées avec HISTO TAQ (**REF** 70975) ou la Taq Polymerase de Qiagen.

Un typage fiable est garanti à condition d'utiliser 50-100 ng d'ADN par mélange réactionnel, à l'exception de la trousse **D Zygosity-TYPE**. En raison du programme PCR prolongé de ce produit, une concentration inférieure en ADN de 30-50 ng par mélange réactionnel doit être utilisée.

## 4. Protocole

### 4.1. Conditions de sécurité et remarques spécifiques

La PCR est une méthode particulièrement sensible qui doit être réalisée par du personnel compétent expérimenté en technologie moléculaire et en sérologie des groupes sanguins. Les recommandations les plus récentes de médecine transfusionnelle et de détermination des groupes sanguins ainsi que d'anamnèse de la

transfusion doivent être respectées pour réduire le risque de typages erronés, en particulier en cas de résultats discordants entre les méthodes d'analyse sérologique et de génétique moléculaire.

Le génotypage des groupes *ABO* et *RHD/RHCE* ainsi que la détermination des spécificités *Kell*, *Kidd*, *Duffy*, *MNS*, *HPA* et *HNA* doivent être réalisés après un test sérologique.

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

- ◆ Porter des gants pour manipuler (sans poudre si possible).
- ◆ Utiliser de nouveaux embouts pour 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 ne pas les échanger.

#### 4.2. Isolement de l'ADN

La trousse **EXTRA-GENE** est parfaitement adaptée pour l'isolement de l'ADN puisque les acides nucléiques pur peuvent être obtenus rapidement à partir de sang total, sans utiliser de produits chimiques ni de solvants toxiques. Par ailleurs, des méthodes commerciales, sur colonne ou sur bille ou d'autres méthodes décrites dans la bibliographie, permettent d'obtenir un ADN de pureté satisfaisante. La présence d'héparine peut inhiber la PCR. De ce fait, il est recommandé d'utiliser du sang recueilli sur EDTA ou sur citrate pour le typage. Les indices de pureté de l'ADN doivent être les suivants :

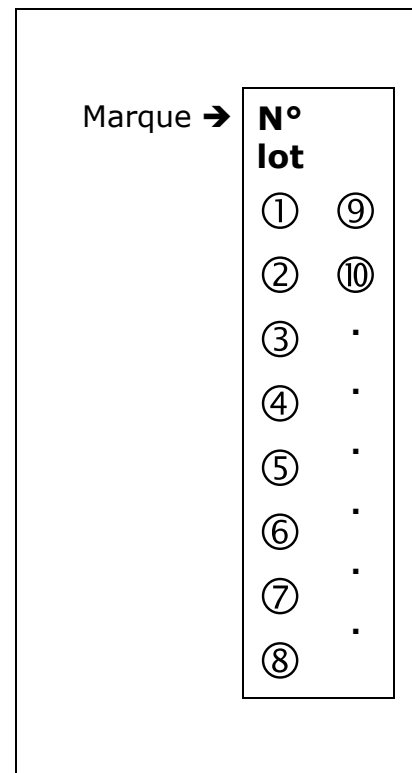
- ◆  $DO_{260}/DO_{280} > 1,5$  et  $< 2,0$  : indicateur de contamination par de l'ARN ou des protéines
- ◆  $DO_{260}/DO_{230} > 1,8$  : indicateur de contamination par des sels, des glucides ou des solvants organiques

#### 4.3. Amplification

Tous les mélanges réactionnels pré-aliquotés et séchés 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 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 trousse BAGene utilisent le même mélange initial et peuvent de ce fait être combinées, à l'exception de la trousse **D Zygosity-TYPE** pour laquelle la concentration d'ADN recommandée est différente. La composition du mélange initial est indiquée dans le tableau 1.

**Tableau 1** Composition du mélange initial selon le nombre de cupules réactionnelles



<b>Nb de cupules</b>	<b>Eau distillée</b>	<b>Tampon PCR 10 x</b>	<b>Solution ADN (50-100 ng/μL) ♡</b>	<b>Taq (5 U/μL)</b>	<b>Volume total</b>
<b>1</b>	8	1	1	0,08	<b>10 μL</b>
<b>2</b>	16	2	2	0,2	<b>20 μL</b>
<b>6★</b>	50	7	7	0,5	<b>65 μL</b>
<b>7</b>	70	9	9	0,7	<b>90 μL</b>
<b>8</b>	80	10	10	0,8	<b>100 μL</b>
<b>9</b>	88	11	11	0,9	<b>110 μL</b>
<b>10</b>	96	12	12	1,0	<b>120 μL</b>
<b>11</b>	104	13	13	1,0	<b>130 μL</b>
<b>12</b>	112	14	14	1,1	<b>140 μL</b>
<b>13</b>	128	16	16	1,3	<b>160 μL</b>
<b>14</b>	136	17	17	1,4	<b>170 μL</b>
<b>15</b>	144	18	18	1,4	<b>180 μL</b>
<b>16</b>	152	19	19	1,5	<b>190 μL</b>

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

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

♡ Pour la trousse **D Zygosity-TYPE** il est recommandé d'utiliser une concentration en ADN de **30-50 ng/μL**.

3. Homogénéiser au Vortex et distribuer ensuite **10µL** de ce mélange dans **chacune** des cupules réactionnelles pré-aliquotées.

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.

En cas d'utilisation de thermocycleurs équipés de capot fermé étroitement, il est également possible d'utiliser des tapis de silicone réutilisables.

Agiter légèrement la plaque pour dissoudre le résidu bleu situé au fond de la cupule. 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 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.

**Paramètres d'amplification pour toutes les trousse BAGene sauf D Zygoty-TYPE**

Étape	Durée	T°	Nb de cycles
Première dénaturation	<b>5 Min</b>	96°C	1 Cycle
Dénaturation	10 Sec	96°C	5 Cycles
Hybridation + extension	60 Sec	70°C	
Dénaturation	10 Sec	96°C	10 Cycles
Hybridation	50 Sec	65°C	
Extension	45 Sec	72°C	
Dénaturation	10 Sec	96°C	15 Cycles
Hybridation	50 Sec	61°C	
Extension	45 Sec	72°C	
Extension finale	5 Min	72°C	1 Cycle

**Thermocycleurs validés**

PTC 100/200/C1000 (MJ Research/ BioRad), GeneAmp PCR-System 9700 (utiliser la vitesse de montée en température du modèle 9600) (ABI), Mastercycler epGradient S (utiliser la fonction « Simuler le gradient Mastercycler ») (Eppendorf), Tprofessional (Biometra)

**ATTENTION :** programme PCR différent

**Paramètres d'amplification pour la trousse D Zygoty-TYPE**

Étape	Durée	T°	Nb de cycles
Première dénaturation	<b>10 Min</b>	95°C	1 Cycle
Dénaturation	20 Sec	92°C	35 Cycles
Hybridation	30 Sec	64°C	
Extension	5 Min	68°C	
Extension finale	5 Min	72°C	1 Cycle

**Thermocycleurs validés**

Voir paramètres d'amplification pour toutes les trousse BAGene.

**Ne pas utiliser de bloc chauffant en aluminium (par ex. avec le GeneAmp PCR-System 9700).**

**En cas d'utilisation de thermocycleurs présentant des vitesses très rapides de montée et de descente en température, il est recommandé d'utiliser une vitesse plus lente de montée et de descente en température (~2,5 °C/s).**

**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 manquantes) : 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.

**Il est recommandé d'utiliser uniquement des thermocycleurs régulièrement étalonnés. La trousse BAG-Cycler Check (REF 7104) est recommandée pour le contrôle des thermocycleurs.**

#### **4.4. Électrophorèse sur gel**

La séparation des produits d'amplification est réalisée par électrophorèse sur un gel (horizontal) d'agarose. 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 soigneusement 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 10-12 V/cm (avec une distance de 20 cm entre les électrodes, soit environ 200-240 V) pendant 20-40 minutes. Une durée de 40 minutes est recommandée pour améliorer la séparation des bandes avec la trousse **D Zygoty-TYPE**. 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 20-30 minutes.

#### **4.5. Documentation**

Pour la documentation, visualiser l'amplification PCR à l'aide d'un transilluminateur UV (220-310 nm) et la photographier avec un système de documentation du 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). Reporter les résultats sur la fiche de travail fournie (voir paragraphe 4.6).

#### **4.6. Interprétation des résultats et limites de la méthode**

##### **4.6.1. Général**

Les résultats des déterminations en génétique moléculaire réalisées avec les trousse BAGene sont documentés sur les fiches de travail fournies.

Celles-ci comportent un tableau répertoriant les caractéristiques, spécificités, phénotypes et génotypes ainsi qu'un exemple de schéma réactionnel pour faciliter l'interprétation. Les préparations PCR disposent chacune d'un numéro de réaction (p. ex., ABO-TYPE, réactions n°1-8).

La fiche de travail indique sous les numéros de réaction la longueur du fragment des produits PCR spécifiques en pb. Les schémas possibles de bandes dans le gel sont présentés dans les lignes qui suivent.

Des produits PCR spécifiques (réaction positive) sont indiqués par le signe + et les cases correspondantes du diagramme sont colorées (ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygosity-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, HPA-TYPE, HNA-TYPE – **vert**, autre RH-TYPE **rouge, rose et bleu**).

L'évaluation des schémas réactionnels est réalisée en lignes, de la gauche vers la droite.

Seules les bandes présentant une taille conforme par rapport à l'échelle ADN doivent être considérées positives. Les tailles conformes des amplicons spécifiques sont indiquées sur la fiche de travail. Pour toutes les pistes sans amplification spécifique d'allèle, le contrôle interne doit apparaître à **434 pb** (sauf pour la trousse **D Zygosity-TYPE** et la réaction PCR avec le **mélange n° 2** de la trousse **RH-TYPE** pour lesquelles la longueur du contrôle interne est de **659 pb**). Dans la plupart des cas avec une amplification spécifique d'allèle, le contrôle interne est plus faible ou absent. 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 trousses 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. Le séquençage de ces échantillons est recommandé. Les résultats de typage doivent être interprétés en tenant compte de la variation génétique dans les différents groupes ethniques. En cas de doute, le phénotype est valide.

#### 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 des 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 *A*<sup>2</sup> sont détectés avec la trousse **ABO-TYPE variant**, d'autres variants d'allèle *B* ou *A*<sup>2</sup> peuvent être masqués derrière les résultats PCR respectivement **ABO\*B101** et **ABO\*A201**. La plupart des allèles *B*<sup>(A)</sup> et *cis AB* présentent également un résultat positif à la réaction *ABO\*B101*.

Des explications détaillées sont fournies sur une notice d'information complémentaire pour l'évaluation de chaque trousse **ABO-TYPE variant**. Veuillez consulter les remarques particulières sur la fiche de travail de la trousse **ABO-TYPE** ainsi que celle de la trousse **ABO-TYPE variant**.

Une bande spécifique de l'hormone HGH d'une longueur de 434 pb apparaît comme contrôle interne.



### 4.6.3. RH-TYPE

La détermination par génétique moléculaire du *RHD* standard ainsi que de certains variants *RHD* (haplotypes *RHD* positifs dans des échantillons D négatifs en sérologie, D partiel) sont réalisés dans les réactions PCR désignées.

Les préparations 1 et 2 sont des réactions PCR multiplexes pour examiner 5 polymorphismes *RHD* (intron *RHD* 4 et 7, exon 7, ainsi que la détermination spécifique de *RHD*(W16X) et de *RHD*Ψ). Ceci signifie que contrairement à toutes les autres trouses **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*Ψ

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

- ◆ Produit PCR **224 pb** – identification **verte**, schéma réactionnel dans la case avec un fond **vert**
- ◆ 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 **rouge**, schéma réactionnel dans la case avec un fond **rouge**
- ◆ Produit PCR **390 pb** – identification **verte**, schéma réactionnel dans la case avec un fond **vert**

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 une catégorie D, un examen supplémentaire à l'aide de la trousse **Partial D-TYPE** doit être réalisé afin d'exclure les mutations ponctuelles pouvant être à l'origine de ces résultats.

### 4.6.4. Partial D-TYPE

Une bande manquante dans la réaction n°4 peut indiquer un DFR (sérologie faiblement positive avec l'anti-D) ou un *RHD*Ψ (hémi- ou homozygote, D négatif en sérologie). En l'absence d'information sérologique, la confirmation ou l'exclusion du *RHD*Ψ peut être obtenue par la trousse **RH-TYPE**. En présence d'un type 41 et 45 de D faible, le mélange n° 9 peut présenter une absence de réaction. Des mutations de parties de l'intron peuvent également conduire à une réaction manquante dans les mélanges 8 ou 9. En présence d'un type 20 de D faible, la réaction n° 10 n'affiche généralement aucune bande. Parfois une bande faible apparaît.

Il n'est pas possible à l'heure actuelle de différencier par génétique moléculaire les variants **DCS**, **DFW**, **DIM** et **DNU** de D du type *RHD* standard. La prise en compte des haplotypes est utile.

#### 4.6.5. D Zygoty-TYPE

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 positive de la *boîte rhésus* aval indique la présence d'un allèle *RHD* (*RHD* positif), sauf dans le cas du *RHD* $\Psi$  homozygote et hémizyote. La réaction est ici négative malgré la présence d'un allèle *RHD*.

De plus, le résultat peut également être faussement négatif en présence d'une *boîte rhésus* aval modifiée génétiquement, même si l'échantillon présente un résultat sérologique D positif. En cas de résultat sérologique D positif et de PCR positive pour la *boîte rhésus* hybride, la conclusion est donc « Dd ». Le résultat est « DD » quand un résultat PCR est négatif pour la *boîte rhésus* hybride.

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* $\Psi$  et d'un autre allèle *RHD*.

En cas d'absence d'une *boîte rhésus* hybride dans la population africaine, les résultats des allèles *RHD* $\Psi$  et *Cde*<sup>s</sup> obtenus par la trousse **RH-TYPE** doivent être pris en compte. D'autres allèles *RHD* négatifs de l'antigène D ne peuvent pas être exclus avec les trousse de tests actuellement disponibles. Ceci doit être pris en compte dans l'interprétation des résultats. Cependant, l'incidence de ces allèles dans la population blanche est très faible.

L'ADN dégradé peut produire des résultats faussement négatifs. Ceci est indiqué soit par des bandes uniquement pour le contrôle interne, soit par l'absence totale de bandes.

## 5. Avertissements et précautions

Le bromure d'éthidium est un agent mutagène puissant. Éviter les contaminations et le contact avec la peau. Consulter les instructions d'utilisation 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.

Tous les produits biologiques utilisés pour l'extraction d'ADN, par exemple le sang ou un tissu humain, doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses. Il est 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 produits biologiques doivent être inactivés avant leur élimination (p. ex., dans 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., dans un autoclave).

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

Les fiches de données de sécurité (FDS) peuvent être téléchargées à l'adresse [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com).

## 6. Dépannage

Problème	Raison possible	Solution
Pas d'amplification, échelle ADN visible	ADN contaminé par des inhibiteurs de PCR, ADN dégradé	Ré-isoler l'ADN, essayer d'autres méthodes
	Concentration en ADN trop élevée ou trop faible	Modifier la concentration en ADN, ré-isoler l'ADN
	Enzyme absente ou en concentration trop faible	Faire 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 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 étroitement les tubes avec leurs bouchons
Amplification non spécifique, bandes supplémentaires (les bandes supplémentaires d'une taille non significative doivent être négligées)	Contamination par les produits d'amplification	Décontaminer, refaire le typage, respecter des conditions de travail propres
	ADN contaminé par des sels	Ré-isoler 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 4.3) ☆
Le résultat donne plus de 2 spécificités	Contamination croisée (produits d'amplification), nouvel allèle	Vérifier les mélanges de typage sans ajouter d'ADN, respecter des conditions de travail propres, décontaminer
Pas de bandes visibles ou bandes très faibles, échelle ADN invisible	Coloration à l'EtBr trop faible	Refaire la coloration
Le fond du gel est trop clair	Durée de coloration à l'EtBr 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 périmé, mauvais tampon d'électrophorèse, gel non entièrement polymérisé	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 discordante.

## 7. Bibliographie

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

Consulter le site [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com) pour obtenir d'autres références.

## 8. Explication des symboles utilisés

	Date de péremption
	Température de conservation
	Consulter la notice technique d'utilisation
	Suffisant pour n tests
<b>BLOOD TYPING</b>	Destiné à la détermination du groupe sanguin
<b>CONT</b>	Contenu, contient
<b>HNA TYPING</b>	Destiné au génotypage des systèmes HNA
<b>HPA TYPING</b>	Destiné au génotypage des systèmes HPA
<b>IFU</b>	Notice technique d'utilisation
<b>IVD</b>	Pour usage de diagnostic <i>in vitro</i>
<b>LOT</b>	N° de lot
<b>PCRBUF   10x</b>	Tampon PCR, concentré 10x
<b>PCRCAP</b>	Bouchons PCR
<b>PCRPLATE</b>	Plaques PCR
<b>PCRSTRIP</b>	Barrettes PCR
<b>REACTIONMIX</b>	Mélange réactionnel
<b>REF</b>	Code produit
<b>RTU</b>	Prêt à l'emploi
<b>WORKSHEET</b>	Fiche de travail

Pour obtenir de plus amples informations, consulter le site Internet [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com) ou écrire à l'adresse [info@bag-healthcare.com](mailto:info@bag-healthcare.com).

**N.B. :** pour les *modes d'emploi* en d'autres langues, veuillez utiliser ce lien : <http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/>



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5  
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0

Fax: +49 (0) 6404 / 925-250

[www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com)

[info@bag-healthcare.com](mailto:info@bag-healthcare.com)

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-450

Fax: +49 (0) 6404 / 925-460

[verkauf@bag-healthcare.com](mailto:verkauf@bag-healthcare.com)

Customer Service:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125

Fax: +49 (0) 6404 / 925-421

[service@bag-healthcare.com](mailto:service@bag-healthcare.com)