

FR

HLA SSP Kits

SSP-Reagenzienkit für die HLA-Typisierung auf DNA-Basis
Ready to use SSP reagent kit for DNA based HLA typing
Trousse de réactifs SSP pour le typage HLA, basé sur l'ADN
Kit di reagenti SSP per tipizzazione HLA basata sul DNA
Juego de reactivos SSP para la tipificación del antígeno

IVD

For In Vitro Diagnostic Use

HLA-A SSP	REF	826 201	CE 0197
HLA-B SSP	REF	826 206	CE 0197
HLA-C SSP	REF	826 212	CE
DRB SSP	REF	826 215	CE 0197
DQB SSP	REF	826 220	CE
ABDR SSPtray	REF	826 230	CE 0197
ABC SSPtray	REF	826 240	CE 0197

**Besondere Hinweise für den Anwender / Special remarks for the user /
Remarques importantes pour l'utilisateur / Avvertenze per l'utilizzatore /
Indicaciones importantes para el usuario:**

SSP TYPING KITS WITH TAQ-POLYMERASE - LIMITED LICENSE:

The purchase price of this product includes limited, non-transferable rights under U.S. Patents 4,683,202, 4,683,195 and 4,965,188 and their foreign counterparts, owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"), to use only this amount of the product to practice the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process described in said patents solely for the HLA Typing applications of the purchaser solely for organ or tissue or bone marrow transplantation, and explicitly excludes analysis of forensic evidence or parentage determination. The right to use this product to perform and to offer commercial services for HLA Typing for organ or tissue transplantation using PCR, including reporting the results of the purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is also hereby granted. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

SSP TYPING KITS WITHOUT TAQ-POLYMERASE - DISCLAIMER OF LICENSE:

This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process which is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). No license under these patents to use the PCR Process is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

REF	GB DE ES IT FR NL DK CZ	Article number Artikelnummer Artikulo numero Codice prodotto Référence du produit Artikelnummer Artikelnummer Katalogové číslo	IVD	GB DE ES IT FR NL DK CZ	For in vitro diagnostic use Nur zur in-vitro Diagnostik Sólo para el diagnóstico in vitro Solo per la diagnostica in vitro Pour le diagnostic in vitro Voor in vitro gebruik Til diagnostik brug i glas Použití pro in vitro diagnostiku			
BLOCK	GB DE ES IT FR NL DK CZ	PCR block PCR-Block PCR bloque PCR blocco PCR bloc PCR blok PCR blok PCR blok	NC	GB DE ES IT FR NL DK CZ	negative control Negativkontrolle control negativo controllo negativo contrôle négatif negatieve controle negativ kontrol negativní kontrola	CK	GB DE ES IT FR NL DK CZ	PCR cocktail PCR-Cocktail PCR coctel PCR cocktail PCR cocktail PCR cocktail PCR blandings PCR koktejl

TABLE DES MATIERES

1.	Introduction	4
1.1	Objectif du test	4
1.2	Bases théoriques	4
1.3	Principe du test	4
2.	Réactifs	3
2.1	Contenu des trousse HLA SSP	3
2.2	Mises en garde et mesures de précaution	4
2.3	Stockage et durée de conservation	4
3.	Appareils nécessaires	5
3.1	Programmation du thermocycler	5
3.2	Electrophorèse sur gel	6
4.	Recueil et préparation des prélèvements	6
4.1	Isolement de l'ADN	6
4.2	Préparation des prélèvements	6
5.	Procédure du test	7
5.1	Matériel nécessaire	7
5.2	Matériel supplémentaire nécessaire	7
5.3	PCR	7
5.4	Electrophorèse sur gel	8
6.	Résultats	9
6.1	Interprétation	8
6.2	Limites du test	9
6.3	Contrôle de qualité	9
6.4	Critères de performance	9
7.	Causses d'erreurs	11
8.	Références bibliographiques	12

1. Introduction

1.1 Objectif du test

Les trousse HLA SSP (Sequence Specific Primers) sont utilisées pour déterminer les allèles HLA de classe I et de classe II.

1.2 Bases théoriques

Le système HLA est un système antigénique complexe de transmission héréditaire co-dominante qui joue un rôle important dans le système immunitaire dans la reconnaissance du "moi" et du "non-moi". Lors des greffes d'organe, la compatibilité des antigènes HLA entre donneur et receveur a une importance décisive pour la survie du greffon. La détermination des antigènes HLA est une des bases de la sélection donneurs-receveurs.

De nouvelles dimensions se sont ouvertes pour le diagnostic par l'introduction des méthodes de détection basées sur l'ADN. Les antigènes HLA peuvent différer par la position d'un seul acide aminé au niveau de la chaîne polypeptidique. Souvent il est impossible de différencier ces structures quasiment identiques à l'aide de la sérologie, c'est pour cette raison que le niveau de résolution des méthodes sérologiques est limité. Etant donné que les séquences d'ADN de la plupart des allèles HLA sont maintenant connues, il est possible d'identifier les variations de ces séquences à l'aide d'oligonucléotides synthétiques. Grâce à une amplification de l'ADN génomique (PCR = Polymerase Chain Reaction – réaction d'amplification génique), utilisant des paires d'amorces spécifiques (SSP, Sequence Specific Primers – amorces spécifiques d'une séquence), il est possible d'identifier un grand nombre des allèles HLA par les méthodes de biologie moléculaire.

1.3 Principe du test

Les trousse HLA SSP sont utilisées pour le typage des spécificités HLA à l'aide d'une technique de PCR. Pour le typage, la méthode SSP utilise des amorces spécifiques d'un allèle lors de la réaction d'amplification. Elle repose sur le principe selon lequel seules les amorces dont les séquences sont totalement complémentaires de la séquence-cible d'un échantillon d'ADN se lient à cet ADN et donnent un produit d'amplification lors d'une réaction de PCR. Les amorces non complémentaires ne se lient pas à l'ADN et il ne se produit pas d'amplification.

L'ADN amplifié est détecté à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose. En cas d'amplification réussie on obtient un fragment d'ADN de longueur définie, reconnaissable dans le gel sous forme d'une bande. En l'absence d'amplification, cette bande n'apparaît pas.

La composition des mélanges d'amorces permet une identification positive des spécificités HLA. Le domaine d'utilisation de ce système de détection est la détermination des différents allèles HLA individuels chez les donneurs et receveurs d'organes et chez les patients recevant des transfusions de sang ou ayant une substitution thérapeutique des composants du sang.

2. Réactifs

2.1 Contenu des trousse HLA SSP

Le contenu des trousse HLA SSP est suffisant pour 24 tests.

- 24 blocs de PCR **BLOCK**, composés de tubes de PCR qui contiennent les mélanges desséchés d'amorces/nucléotides. Afin d'aider à l'identification, un marquage de couleur noire apparaît sur la position 1 (=H1).
- Cocktail de PCR **CK** (prêt à l'emploi)
Le cocktail de PCR contient le tampon de PCR (concentration finale : MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris 10 mM-HCl, 0,001% de gélatine), du rouge de crésol et du glycérol.
- Bouchons ou feuilles adhésives pour tubes de PCR

- Feuilles de travail, schéma des profils de réactions, positions des amorces
Un témoin négatif **NC** est joint en supplément (tube de PCR incolore), s'il n'est pas déjà intégré au bloc de PCR **BLOCK**.

2.2 Mises en garde et mesures de précaution

Réactifs uniquement appropriés pour le diagnostic *in vitro* **IVD**

- Mise en garde:** Le test ne devra être réalisé que par un personnel spécialisé formé et autorisé.
- Mise en garde:** Utiliser tous les réactifs uniquement en respectant les réglementations et les mesures de précaution en vigueur. Le matériel provenant des patients devra être considéré comme potentiellement infectieux. Ne pas pipeter à la bouche.
- Mise en garde:** Tous les réactifs pour le test devront être maniés comme étant potentiellement infectieux et les mesures de précaution correspondantes devront être mises en œuvre.
- Mise en garde:** Les blocs de PCR utilisés devront être maniés comme étant potentiellement infectieux et devront être éliminés en conformité avec les réglementations nationales en vigueur.
- Mise en garde:** Ne pas utiliser de réactifs après la date de péremption figurant sur les étiquettes.
- Mise en garde:** Ne pas utiliser de réactifs suspectés de contamination microbienne.
- Mise en garde:** Utiliser une série de pipettes distincte pour le domaine pré-PCR et le domaine post-PCR.
- Mise en garde:** **Le bromure d'éthidium**, utilisé pour la coloration de l'ADN lors de l'électrophorèse sur gel, **est potentiellement carcinogène**. Porter toujours des gants de protection lors du maniement des gels colorés. Élimination des déchets par incinération.
- Mise en garde:** Lors des étapes sous lumière UV, porter toujours des lunettes protectrices, bloquant les rayons UV.

Les formulaires des données de sécurité d'emploi pour tous les réactifs peuvent être demandés auprès de Biotest.

2.3 Stockage et durée de conservation

Les réactifs SSP (**BLOCK**, **CK**, **NC**) doivent être stockés à une température comprise entre 2 et 8°C. La date de péremption figure sur les emballages des composants de la trousse. Les blocs de PCR **BLOCK** sont scellés dans des sachets. Une fois le sachet ouvert, les blocs non utilisés devront être maintenus dans l'emballage d'origine qui sera refermé hermétiquement afin d'empêcher la pénétration d'humidité. Les blocs de PCR entamés devront être utilisés dans un délai de 4 semaines.

3. Appareils nécessaires

3.1 Programmation du thermocycler

Programme pour HLA SSP:

Dénaturation initiale:	94°C	2 min.		
Dénaturation:	94°C	10 s]	10 cycles
Hybridation et Elongation:	65°C	60 s		
Dénaturation:	94°C	10 s]	20 cycles
Hybridation:	61°C	50 s		
Elongation:	72°C	30 s		

Le programme de PCR figurant ci-dessous est adapté au thermocycler de la Société Perkin Elmer. La vitesse de réchauffement/refroidissement pour le PE 9700 est de 1°C/seconde pour les échantillons et la précision de la température indiquée est en moyenne de $\pm 0,25^\circ\text{C}$ pour une gamme de 35-100°C. D'autres thermocyclers que ceux recommandés devront être validés par l'utilisateur. Les thermocyclers qui ne possèdent pas de plaques de serrage ajustable nécessitent une natte d'adaptation pour garantir une transmission optimale de la chaleur du couvercle chauffant aux tubes de PCR.

3.2 Electrophorèse sur gel

Réalisation de l'électrophorèse sur gel, voir paragraphe 5.

4. Recueil et préparation des prélèvements

4.1 Isolement de l'ADN

L'ADN génomique peut être obtenu à partir de toutes les cellules nucléées. Le plus simple est l'isolement à partir de suspensions cellulaires (sang citraté ou sur EDTA, couche leucocytaire, cellules en culture). Seuls les procédés qui fournissent une qualité et une quantité suffisantes d'ADN tels que la méthode de précipitation (2) peuvent entrer en ligne de compte pour les tests de PCR-SSP.

A titre d'exemple, parmi les offres de trousse d'extraction de l'ADN du commerce "Puregene" de la Société Genra Systems ou "Super Quick Gene" de la Société Analytical Genetic Testing Center sont appropriées.

4.2 Préparation des prélèvements

4.2.1 Prélèvements

Du sang périphérique anticoagulé (par exemple: sur citrate de sodium, sur EDTA) est nécessaire pour le typage. Des informations concernant le stockage et la stabilité des prélèvements sanguins devront être obtenues auprès des vendeurs des trousse d'extraction de l'ADN et devront être validées par l'utilisateur.

4.2.2 Contamination

La contamination de l'ADN par des inhibiteurs de la PCR tels que l'hémoglobine, l'héparine, l'éthanol, etc., peut entraîner une perturbation sensible de la réaction. Pour cette raison, **ne pas utiliser** du sang prélevé sur héparine, mais du sang prélevé sur citrate ou sur EDTA comme matière première pour l'isolement de l'ADN. Si le patient est sous traitement à l'héparine, utiliser alors une autre source pour l'extraction d'ADN.

4.2.3 Prélèvement hémolysé

Eviter l'utilisation de prélèvements lipémiques ou hémolysés. Les prélèvements ne contenant pas d'anticoagulants ou les prélèvements congelés et décongelés à plusieurs reprises, ne sont pas conseillés car ces conditions ne fournissent pas la garantie que l'ADN isolé est présent en qualité et quantité suffisante.

4.2.4 Quantité de l'ADN

Remettre en suspension l'ADN isolé dans de l'eau distillée stérile et ajuster à la concentration de 100 ± 50 ng/ μ l. L'ADN **ne devra pas être remis en suspension** dans des réactifs qui contiennent des chélateurs tels que l'**EDTA** à une concentration $> 0,5$ mM.

4.2.5 Qualité de l'ADN

La concentration de l'ADN est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm (A_{260}). La valeur $A_{260} = 1$ (= DO 1,0) correspond à environ 50 μ g/ml d'ADN bicaténaire.

En vue de déterminer le degré de contamination de l'ADN par des protéines, on peut procéder en complément à une mesure à 280 nm et calculer le quotient A_{260}/A_{280} . L'ADN pur donne un quotient de 1,8 ou plus. Si le quotient A_{260}/A_{280} est inférieur à 1,8, il s'agit d'un indice en faveur d'une contamination de l'ADN par des protéines.

Pour un quotient A_{260}/A_{280} égal à 1,5, le pourcentage de protéines de la préparation d'ADN est de l'ordre de 50 %.

Pour obtenir des bons résultats lors du test de PCR-SSP, il faut un ADN dont le quotient A_{260}/A_{280} est $\geq 1,6$.

- ☞ La pureté et la concentration de l'ADN utilisé ont une importance décisive pour un résultat optimal du test.

L'ADN isolé peut être stocké à une température de -20°C pendant une période prolongée (supérieure à 1 an). Pour des précisions concernant le stockage et la stabilité de l'ADN isolé, se reporter à l'information technique du fabricant de la trousse d'extraction de l'ADN utilisée.

5. Procédure du test

5.1 Matériel nécessaire

Voir paragraphe 2.1 Contenu de la trousse HLA SSP.

5.2 Matériel complémentaire nécessaire

5.2.1 Matériel des prélèvements (ADN)

- Spectrophotomètre UV

5.2.2 PCR

- Taq ADN polymérase (5 U/ μ l, par exemple PE Applied Biosystems)
- Thermocycler avec couvercle chauffant (par exemple PE 9600, PE 9700 PE Applied Biosystems)
- Pipettes réglables
- Multipipette d'Eppendorf avec extrémités combitip (10 μ l)
- Embouts de pipettes avec filtre
- Eau distillée (dH_2O)

5.2.3 Electrophorèse sur gel

- Agarose (pour biologie moléculaire)
- Chambre de gel (approprié à un gel comportant au minimum 25 puits)
- Tampon TBE 5 x
Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (base)
Acide borique (H_3BO_3)
 Na_2EDTA
- Solution de bromure d'éthidium (10 mg/ml)
- Etalon de longueur d'ADN (marqueur de 50-1000 pb) (non absolument nécessaire)
- Agitateur magnétique avec plaque chauffante ou four à micro-ondes
- Pipettes réglables
- Caméra Polaroid avec filtre UV, film Polaroid type 667
- Transilluminateur UV ($\sim 200\text{-}300$ nm)

- Source d'alimentation en courant
- Eau distillée (dH₂O)

5.3 PCR (Polymerase Chain Reaction – réaction d'amplification génique)

5.3.1 Mesures de précaution

La PCR est une méthode extrêmement sensible qui permet d'amplifier efficacement les quantités les plus faibles d'ADN. De ce fait même des traces d'ADN, contaminantes dans un échantillon, sont amplifiées lors de la réaction de PCR et peuvent fausser le résultat du test. Une source de contamination particulière est l'ADN amplifié qui entre en contact avec des échantillons qui sont encore à amplifier. Pour éviter les contaminations, il est recommandé de respecter une séparation stricte des domaines de travail dans l'espace comme suit :

1. Locaux pré-PCR:
Tous les préparatifs avant la PCR (isolement et stockage de l'ADN, prise d'essai de la PCR, préparation et stockage des réactifs et des solutions utilisées pour l'extraction de l'ADN et pour la PCR).
2. Locaux post-PCR:
Thermocycler, électrophorèse sur gel, interprétation, stockage de l'ADN amplifié.
Les appareils et les produits consommables du domaine post-PCR ne devront pas être déplacés dans le domaine pré-PCR.
3. Pour les manipulations dans les locaux pré-PCR, utiliser des pipettes conférant une protection contre les aérosols (extrémités des pipettes munies d'un filtre). Il est recommandé d'utiliser conjointement un témoin négatif lors de chaque amplification afin de mettre en évidence une éventuelle contamination par un ADN étranger.

5.3.2 Réalisation d'un typage HLA SSP

- (1) Pour un typage HLA d'un échantillon d'ADN, les réactions de PCR sont réalisées avec un volume de 10 µl pour chaque tube de PCR. Le marquage en noir sur le bloc de PCR **BLOCK** sert d'orientation (Position H1).
- (2) Pour **chaque typage**, préparer un **mélange-mère** des composants suivants dans un tube Eppendorf:

Cocktail de PCR **CK** Taq ADN polymérase (5U/µl)
dH₂O
(voir le tableau suivant pour différentes configurations)

Bien mélanger et placer 10 µl de ce mélange dans le **NC**.
Seulement ensuite ajouter l'ADN (environ 100 ± 50 ng/µl) et bien mélanger

Les volumes à préparer en fonction du nombre des tubes PCR figurent dans le tableau suivant:

Nombre de réactions de PCR	Composition du mélange-mère pour:				
	8	18	24	48	96
Cocktail de PCR CK	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq ADN polymérase	0,7 µl	1,5 µl	1,8 µl	3,5 µl	7 µl
dH ₂ O	55 µl	125 µl	150 µl	288 µl	550 µl
ADN (environ 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

- (3) Distribuer chaque fois 10 µl de ce mélange-mère dans les mélanges d'amorces spécifiques séchées. De préférence utiliser une multipipette. Afin d'éviter une contamination des amorces,

faire attention à ce que l'extrémité de la pipette n'entre pas en contact avec les amorces. Pour cela déposer le mélange-mère sur la paroi du tube.

- (4) Fermer hermétiquement les barrettes de PCR à l'aide des bouchons ou des feuilles adhésives joints. Placer la plaque dans le thermocycler et débiter la PCR avec le programme SSP.

5.4 Electrophorèse sur gel

Les produits de PCR sont mis en évidence grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose, suivie d'une détection des bandes d'ADN en lumière UV.

5.4.1 Préparation des réactifs

- **Tampon TBE 5 x** (Tris 0,445 M-borate, EDTA 0,0125 M):
54 g de Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane (base)
27,5 g d'acide borique (H_3BO_3)
4,65 g de Na_2EDTA
dans 1000 ml d'eau distillée, stockage à température ambiante
- **Solution de bromure d'éthidium** (10 mg/ml)
Dissoudre 100 mg de bromure d'éthidium dans 10 ml de dH_2O et stocker à une température comprise entre 2...8°C, à l'abri de la lumière.
Mise en garde: Le bromure d'éthidium est mutagène et toxique. Lors du maniement de bromure d'éthidium (y compris sous une forme diluée), porter des gants protecteurs. En cas de contact avec la peau, rincer immédiatement avec une grande quantité d'eau.
- **Tampon TBE 1 x**
Dilution finale 1: 5 du tampon TBE 5 x dans de l'eau déminéralisée.

5.4.2 Réalisation

Préparer un gel d'agarose à 2 % : porter à ébullition 5 g d'agarose dans 250 ml de TBE 1x jusqu'à dissolution complète. Laisser refroidir la solution à une température < à 60° C en agitant et ajouter 4 µl de solution de bromure d'éthidium. Verser ensuite la solution d'agarose sans faire de bulles d'air dans le support de gel préparé et étanche. Mettre en place des peignes pour créer des puits de 10 µl et laisser reposer pendant au moins 10 minutes à température ambiante. Après polymérisation de l'agarose, placer le gel dans la chambre à gel. Retirer les peignes et recouvrir le gel de TBE 1x. Les puits du gel doivent être complètement recouverts de tampon. Distribuer la totalité de la préparation PCR (10 µl) dans les puits du gel. Afin de contrôler la taille des produits de PCR, il est recommandé d'utiliser un standard approprié de poids moléculaire (marqueur 50-1000 bp) lors de l'électrophorèse. L'électrophorèse se fait pendant 15 à 25 minutes à 8 V/cm (écart entre les électrodes). La distance de migration du rouge crésol devrait être de l'ordre de 1 à 1,5 cm.

5.4.3 Documentation

Au terme de l'électrophorèse le gel est placé sur un transilluminateur UV et photographié afin d'interpréter et documenter les résultats.

Attention: Il est conseillé de porter un dispositif adéquat de protection du visage contre les rayons UV.

6. Résultats

6.1 Interprétation

Les mélanges d'amorces HLA Biotest contiennent des amorces témoins qui amplifient un fragment de l'hormone de croissance de l'homme (human growth hormone, HGH), long de 1069 pb.

Ces amorces présentent une concentration plus faible que les paires d'amorces spécifiques des allèles et servent de contrôle interne de l'amplification.

Cette amplification témoin a généralement toujours lieu, c'est-à-dire aussi bien en présence qu'en l'absence d'un fragment de PCR spécifique d'un allèle ou d'un groupe. La bande témoin est donc visible dans toutes les prises d'essai d'amplification génique.

En présence d'un produit de PCR spécifique d'un groupe HLA, la bande témoin peut être faible ou totalement absente. Ceci ne constitue pas une limite du test, car la bande spécifique retrouvée témoigne dans de tels cas du déroulement correct de l'amplification.

L'interprétation du test repose sur le fait de savoir si une bande d'ADN spécifique est présente dans le gel ou non. La taille des fragments amplifiés d'ADN ne devra pas nécessairement être prise en compte, mais pourra l'être à titre d'aide lors de l'interprétation du test.

Pour l'interprétation, le profil des bandes spécifiques est transposé sur les feuilles de travail jointes et le résultat du typage est lu à l'aide des schémas des profils de réactions.

Interprétation du gel

	Réaction positive	Réaction positive	Réaction négative	Pas d'amplification
Puits du gel				
Bande-témoin	Absente	-----		Absente
Bande spécifique			Absente	Absente
Bande de l'amorce				

6.2 Limites du test

1. L'intensité des bandes peut varier en fonction de la qualité et de la quantité d'ADN utilisé. La quantité de produit PCR correspond à l'intensité des bandes rendues visibles à la lumière UV.
2. Si 1 ou 2 amplifications PCR sont manquantes, il faut examiner dans quelle mesure leur évaluation positive aurait conduit à un résultat de typage. Si cela est le cas, le test doit alors être répété. Si l'évaluation des amplifications manquantes n'aboutit pas à un résultat de typage, et s'il y a à l'évidence la détermination de deux allèles, il n'est pas nécessaire d'entreprendre d'autres mesures. Cependant, si un seul allèle a été déterminé, le test doit être répété.
3. L'utilisation d'une polymérase Taq ADN différente de celle recommandée par PE Applied Biosystems peut conduire à des défaillances, mais aussi à des amplifications au PCR non spécifiquement et faussement positives.
4. Les échantillons d'ADN devront être utilisés directement après l'isolement. Un stockage prolongé (supérieur à 1 an) est uniquement possible à -20°C .
5. L'exactitude des résultats ne peut être garantie que si toutes les directives mentionnées ici ont été strictement respectées.
6. Utiliser ce test uniquement pour la détermination initiale du typage HLA. Il convient de recourir à d'autres explorations cliniques et diagnostiques pour garantir le succès d'une greffe.
7. Les trousse de typage HLA SSP ne permettent pas de séparer toutes les combinaisons d'allèles.

6.3 Contrôle de qualité

Tous les lots produits sont vérifiés vis à vis d'un panel d'échantillons d'ADN représentatif et spécifique de chaque paire d'amorces individuelle.

Un contrôle de qualité des nouveaux numéros de lot peut être réalisé en typant des combinaisons hétérozygotes d'allèles connus réagissant avec la plupart des mélanges d'amorces du kit.

6.4 Critères de performance

Les trousseaux SSP Bio-Rad ont fait l'objet de tests comparatifs avec d'autres trousseaux SSP et SSO disponibles dans le commerce chez 167 sujets (receveurs non sélectionnés de greffe et donneurs potentiels) provenant de deux régions géographiquement distinctes. On a observé une concordance de 100 % (167/167) entre les résultats du test SPP Bio-Rad et les résultats des autres tests SSP et SSO.

	Concordance	Discordance	Total	%
N	167	0	167	100
%	100%	0%		

N = Nombre d'échantillons

7. Causes d'erreurs

PROBLEME	CAUSE	SOLUTION
Aucune bande n'est visible.	Le gel ne contient pas de bromure d'éthidium.	Recolorer le gel dans le bain de coloration (Tampon 1xTBE avec 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium).
Standard de poids moléculaire visible Produit PCR non visible	Erreur dans la préparation de la PCR: ADN ou Taq-polymérase oubliés	Répéter la la préparation PCR
	Conditions erronées des cycles de température.	Vérifier le programme PCR dans le thermocycleur. Le programme mentionné s'applique aux thermocycleurs recommandés PE 9600, PE 9700. Les thermocycleurs autres que les modèles recommandés doivent être validés par l'utilisateur. Les thermocycleurs autres que les modèles recommandés peuvent présenter des vitesses de chauffage ou de refroidissement différentes. Variations possibles du programme PCR: En présence d'amplifications non spécifiques, il est possible de créer des conditions plus rigoureuses en augmentant graduellement la température de recuisson par paliers de 1°C. Au contraire, des amplifications faussement négatives peuvent être la cause de conditions PCR trop rigoureuses. Dans ce cas, il est recommandé d'abaisser graduellement la température d'hybridation de 1°C. Prolonger la durée de dénaturation de 10 à 20 secondes. Prolonger la durée d'élongation de 30 à 60 secondes.
Défaillance d'une ou plusieurs amplifications PCR (bandes de contrôle et échantillon spécifiquement amplifié).		Si 1 ou 2 amplifications de PCR sont manquantes, il faut examiner dans quelle mesure leur évaluation positive aurait conduit à un résultat de typage. Si cela est le cas, le test doit alors être répété. Si l'évaluation positive des amplifications manquantes n'aboutit pas à un résultat de typage, et s'il y a à l'évidence la détermination de deux allèles, il n'est pas nécessaire d'entreprendre d'autres mesures. Si un seul allèle a été déterminé, le test doit être répété. En cas de défaillance de plus de 2 amplifications de PCR, le test doit être répété.
Le gel présente des bandes spécifiques faibles, les bandes de contrôle sont inexistantes ou très faibles.	Quantité d'ADN utilisé trop faible.	Doubler de la quantité d'ADN (réduire le dH ₂ O dans la préparation); utiliser env. 100 ng d'ADN par préparation de PCR.
	Présence d'inhibiteurs de PCR dans la préparation: par ex. éthanol, hémoglobine, héparine, billes	Utiliser du sang prélevé sur EDTA ou sur citrate comme matière première; (bien sécher le sédiment d'ADN après le lavage avec l'éthanol).
	Le pH de la solution d'ADN est trop acide (changement de couleur du cocktail PCR après adjonction d'ADN)	Faire précipiter à nouveau l'ADN et le dissoudre dans l'eau distillée.
	Conditions erronées des cycles de température.	Voir ci-dessus
Bandes spécifiques faibles dans le gel.	Concentration d'ADN trop élevée	Diluer l'ADN; une concentration trop forte d'ADN ou bien un ADN mal dissout peut provoquer dans des cas isolés la défaillance des bandes spécifiques.
	ADN dissout dans du tampon qui contient un inhibiteur de la réaction PCR	Faire précipiter à nouveau l'ADN et le dissoudre dans l'eau distillée.
	Conditions erronées des cycles de température .	Voir ci-dessus
Bandes de contrôle présentes, bandes spécifiques présentes, mais en outre , présence d'une ou plusieurs bandes faibles non spécifiques (réactions faussement positives).	Concentration d'ADN trop élevée	Diluer l'ADN;
	Réactions croisées avec	Vérifier le tableau des profils réactionnels

	d'autres allèles	
	ADN de mauvaise qualité ou contamination de l'ADN	Refaire extraction de l'ADN
Présence de bandes dans la préparation PCR du contrôle négatif	ADN distribué par erreur dans la préparation du contrôle négatif	Refaire éventuellement la préparation ou mentionner le fait dans la documentation d'évaluation
	Contamination des réactifs	Remplacer les réactifs

8. Literatur/ References/ Références bibliographiques/ Bibliografia/ Bibliografía

1. Graham DE (1978)
The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses.
Anal Biochem 85: 609-613
2. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988)
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucl Ac Res 16: 1215
3. Olerup O, Zetterquist H (1992)
HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation.
Tissue Antigens 39: 225-335.
4. Bunce M, O'Neill CM, Barnado MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI (1995)
Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)
Tissue Antigens 46:355-367.