

FR

Notice utilisateur

Trousses HISTO SPOT[®] SSO

Trousses de test pour le typage tissulaire des allèles HLA par méthode de génétique moléculaire

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

IVD

RÉF 726010 : HISTO SPOT [®] A 4D	CE ₀₁₂₃
RÉF 726011 : HISTO SPOT [®] A Xtend	CE ₀₁₂₃
RÉF 726020 : HISTO SPOT [®] B 4D	CE ₀₁₂₃
RÉF 726021 : HISTO SPOT [®] B Xtend	CE ₀₁₂₃
RÉF 726030 : HISTO SPOT [®] C 4D	CE
RÉF 726040 : HISTO SPOT [®] DRB1 4D	CE ₀₁₂₃
RÉF 726041 : HISTO SPOT [®] DRB1 Xtend	CE ₀₁₂₃
RÉF 726045 : HISTO SPOT [®] DRB3/4/5	CE ₀₁₂₃
RÉF 726050 : HISTO SPOT [®] DQB1 4D	CE
RÉF 726051 : HISTO SPOT [®] DQB1 4D / DQA1	CE
RÉF 726060 : HISTO SPOT [®] DPB1 (96 tests)	CE
RÉF 726061 : HISTO SPOT [®] DPB1 (24 tests)	CE
RÉF 726062 : HISTO SPOT [®] DPA1 / DPB1 (96 tests)	CE
RÉF 726063 : HISTO SPOT [®] DPA1/ DPB1 (24 tests)	CE
RÉF 726070 : HISTO SPOT [®] <i>On-Call Typing Kit</i>	CE ₀₁₂₃
RÉF 726071 : HISTO SPOT [®] <i>Coeliac Disease</i>	CE
RÉF 726098 : HISTO SPOT [®] <i>Reagent Kit</i>	CE

Les trousse HISTO SPOT[®] CWD high res ne sont plus commercialisées et ont été retirées de la notice.

Version : 13/2017. Édition : 07-2017.

Table des matières

1.	DESCRIPTION DU PRODUIT	3
2.	PRINCIPE DU TEST	5
3.	MATÉRIEL.....	6
3.1	Réactifs fournis avec les trousse HISTO SPOT [®] , HISTO SPOT [®] 4D, HISTO SPOT [®] Xtend et HISTO SPOT [®] Coeliac Disease.....	6
3.2	Réactifs fournis avec la trousse HISTO SPOT [®] On-Call Typing Kit.....	6
3.3	Réactif fournis dans la trousse HISTO SPOT [®] Reagent Kit.....	6
3.4	Définition des lots et des sous-lots.....	6
3.5	Réactifs et équipements nécessaires mais non fournis	7
4.	CONSERVATION ET STABILITÉ.....	7
5.	PROTOCOLE	8
5.1	Précautions de sécurité et recommandations particulières	8
5.2	Isolement de l'ADN	8
5.3	Amplification	9
5.3.1	Trousses HISTO SPOT [®] , HISTO SPOT [®] 4D, HISTO SPOT [®] Xtend et HISTO SPOT [®] Coeliac Disease.....	9
5.3.2	Trousse HISTO SPOT [®] On-Call Typing Kit	9
5.3.3	Programme de PCR	10
5.4	Hybridation automatisée sur le processeur MR.SPOT [®]	11
5.4.1	Préparation des réactifs.....	11
5.4.2	Démarrage du processeur MR.SPOT [®]	12
5.4.3	Transfert des images sur un PC pour l'interprétation	12
5.4.4	Interprétation des images	12
6.	AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	14
7.	CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DES PERFORMANCES.....	15
7.1	Évaluation.....	15
7.2	Réaction d'amplification PCR.....	15
8.	LIMITES DE LA MÉTHODE.....	15
9.	CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE	15
10.	GESTION DES INCIDENTS	16
11.	MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT	16
12.	EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS SUR LES EMBALLAGES.....	17
13.	Bibliographie.....	19

1. DESCRIPTION DU PRODUIT

Le système HISTO SPOT[®] SSO est un test de diagnostic *in vitro* pour le typage tissulaire des allèles HLA par méthode de génétique moléculaire. Les résultats de typage des allèles obtenus ont une résolution moyenne à haute dans le catalogue CWD 2.0.0 (Mack S.J. *et al.*, 2013). Le système est composé des trousse de typage HISTO SPOT[®], de la trousse de réactifs communs HISTO SPOT[®] *Reagent Kit*, du processeur MR.SPOT[®] et du logiciel d'interprétation HISTO MATCH.

Les trousse de typage HISTO SPOT[®] contiennent tous les composants nécessaires à la réaction PCR ainsi que les cupules réactionnelles avec des sondes d'oligonucléotides spécifiques de séquence immobilisées pour la détection des produits PCR. La trousse HISTO SPOT[®] *Reagent Kit* contient tous les réactifs nécessaires à l'hybridation et à la détection. Elle peut être utilisée en association avec toutes les trousse de typage HISTO SPOT[®]. Le processeur MR.SPOT[®] est spécialement conçu pour être utilisé avec les trousse HISTO SPOT[®], et traite entre 1 et 96 échantillons par cycle. Il automatise l'analyse depuis l'hybridation jusqu'à la détection et la prise d'images qui serviront à l'interprétation des résultats. Le logiciel HISTO MATCH est nécessaire à la lecture des images et à l'interprétation des résultats.

Différents types de trousse sont disponibles selon les applications et les niveaux de résolution.

Trousses HISTO SPOT[®] / HISTO SPOT[®] 4D

Les trousse HISTO SPOT[®] sont conçues pour fournir des résultats sans ambiguïté au minimum au niveau des groupes d'allèles, c'est-à-dire sur le 1^{er} champ dans la nomenclature. Des associations d'allèles différentes, qui recoupent des groupes d'allèle, mais qui présentent le même schéma de sondes positives sont considérées comme ambiguës.

Les trousse de typage HISTO SPOT[®] 4D donnent généralement des résultats sans ambiguïté au niveau allélique (2^e champ), en cas d'utilisation d'un filtre qui ne tient compte que des allèles fréquents (C dans le catalogue CWD 2.0.0).

Trousse HISTO SPOT[®] *On-Call Typing Kit*

La trousse HISTO SPOT[®] *On-Call Typing Kit* contient l'association de tous les tests à réaliser avant une transplantation d'organe. La trousse est conçue pour faciliter autant que possible le flux de travail, en particulier en situation d'urgence. Les barrettes PCR contiennent déjà les amorces d'amplification séchées, et les tests SSO sont combinés sur un support unique (figure 1). Le logiciel d'interprétation HISTO MATCH comporte un flux de travail simplifié et une interprétation combinée de ce test.

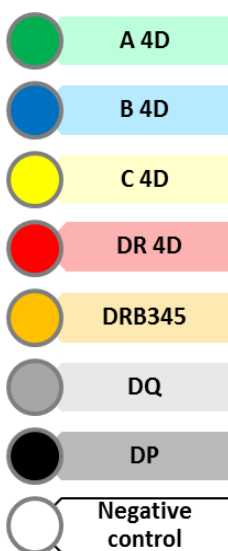


Figure 1. Configuration de la trousse HISTO SPOT[®] *On-Call Typing Kit*

Le contrôle négatif contient les amorces et les sondes pour HLA-A, -B et -DRB1.
(figure modifiée)

Trousses HISTO SPOT® Xtend

Les trousse HISTO SPOT® Xtend comprennent des cupules complémentaires aux trousse HISTO SPOT® 4D et assurent une meilleure résolution, notamment pour les allèles bien documentés (WD) présents dans le catalogue CWD 2.0.0. Elles peuvent généralement être utilisées pour obtenir un résultat de meilleure résolution à l'aide du filtre CWD dans le logiciel HISTO MATCH ou pour résoudre des ambiguïtés sur des échantillons spécifiques.

Trousse HISTO SPOT® *Coeliac Disease*

La maladie cœliaque est une réaction auto-immune déclenchée par le gluten, présent dans plusieurs céréales. Si elle n'est pas diagnostiquée précocement, elle entraîne une inflammation chronique de l'intestin grêle et sa destruction. La maladie cœliaque est fortement associée à l'haplotype DQA1*05:01-DQB1*02:01 et DQA1*03-DQB1*03:02. La trousse HISTO SPOT® *Coeliac Disease* reconnaît les allèles HLA associés et l'interprétation dans le logiciel HISTO MATCH affecte un niveau de risque (basé sur Megiorni et Pizzuti, 2012).

2. PRINCIPE DU TEST

Le test est divisé en quatre étapes de base.

- Isolement de l'ADN
- Amplification par PCR
- Hybridation et détection
- Interprétation des données

L'isolement de l'ADN est réalisé sur l'échantillon clinique, par une méthode d'isolement d'ADN définie au laboratoire ou avec une trousse commerciale. L'ADN est ensuite amplifié par une série de réactions PCR, chacune spécifique d'un locus HLA. Le mélange initial, la solution de $MgCl_2$, les barrettes PCR contenant les amorces et le tampon PCR sont fournis dans la trousse. La spécificité de l'amplification est obtenue par un ensemble d'amorces biotinylées, conçues pour amplifier spécifiquement le locus HLA ciblé. Après le processus d'amplification PCR, la plaque PCR ou les barrettes PCR contenant les amplicons marqués à la biotine sont transférées sur le processeur MR.SPOT[®]. Le processeur MR.SPOT[®] ajoute le tampon d'hybridation à chaque cupule puis transfère chaque mélange amplicon + tampon d'hybridation dans sa cupule réactionnelle contenant une biopuce de sondes d'oligonucléotides spécifiques de séquence (SSO, sequence-specific oligonucleotide) immobilisées. Ces sondes sont soit de simples sondes d'oligonucléotides, soit une association d'au moins 2 sondes individuelles, immobilisées dans la même zone (sonde mosaïque), conçues pour améliorer l'identification des polymorphismes situés en position -cis.

Les amplicons marqués à la biotine se fixent aux sondes SSO qui contiennent une séquence cible complémentaire et ils peuvent ensuite être détectés par une simple réaction colorimétrique. Pour éviter la fixation non spécifique d'amplicons dans des cupules réactionnelles, la toute première tâche du processeur MR.SPOT[®] consiste à traiter chaque cupule avec le tampon de blocage.

Après une étape de lavage drastique pour éliminer tout amplicon non fixé, le conjugué, de la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline, est ajouté aux cupules et se fixe sur la biotine des amplicons s'étant hybridés avec la sonde SSO complémentaire. Suite à des étapes supplémentaires de lavage, le substrat de BCIP/NBT est ajouté et produit une coloration bleu-violet quand il est converti par la phosphatase alcaline. Les points colorés résultants au fond de chaque cupule réactionnelle sont photographiés par une caméra intégrée au processeur MR.SPOT[®] et chaque image est transmise au logiciel HISTO MATCH installé sur le PC de validation du laboratoire. Le programme d'analyse d'image du logiciel HISTO MATCH détermine l'intensité de chaque point (spot) présent sur la biopuce et la compare à l'intensité de son fond. À partir de ces données, les réactions positives et négatives sont déterminées en les comparant à un seuil commun. Le logiciel HISTO MATCH utilise le schéma d'hybridation observé pour déterminer le type HLA.

3. MATÉRIEL

3.1 Réactifs fournis avec les trousse HISTO SPOT[®], HISTO SPOT[®] 4D, HISTO SPOT[®] Xtend et HISTO SPOT[®] Coeliac Disease

- Barrettes de cupules réactionnelles pour le typage HLA emballées individuellement. Chaque barrette renferme 8 tests, et chaque cupule contient des sondes d'oligonucléotides spécifiques de séquence immobilisées.
- **Mélange initial**, prêt à l'emploi, contenant des amorces biotinylées du locus ciblé, des dNTP, de la Taq polymérase, du tampon de réaction et 0,05 % d'azide de sodium.
- **Chlorure de magnésium**, 6 mM, prêt à l'emploi.
- CD contenant la notice utilisateur, le fichier de lot spécifique du sous-lot, le tableau de correspondance et des informations sur les sondes.

3.2 Réactifs fournis avec la trousse HISTO SPOT[®] On-Call Typing Kit

- Barrettes combistrip emballées individuellement contenant les cupules réactionnelles pour le typage HLA associées sur un support en plastique. Les cupules réactionnelles contiennent des sondes d'oligonucléotides spécifiques de séquence immobilisées.
- **Barrettes PCR** contenant des amorces séchées pour l'amplification spécifique des loci HLA à typer. Les amorces correspondent aux loci HLA des barrettes combistrip.
- **Bouchons PCR**.
- **Tampon PCR**, prêt à l'emploi, contenant des dNTP, de la Taq polymérase, du tampon de réaction et de l'azide de sodium à 0,05 %.
- **Chlorure de magnésium**, 6 mM, prêt à l'emploi.
- CD contenant la notice utilisateur, le fichier de lot spécifique du sous-lot, le tableau de correspondance et des informations sur les sondes.

3.3 Réactif fournis dans la trousse HISTO SPOT[®] Reagent Kit

- **Tampon de blocage**, prêt à l'emploi, contient 0,001 % de ProClin[®] 150.
- **Tampon d'hybridation**, prêt à l'emploi, contient 0,001 % de colorant, 0,1 % de dodécylsulfate de sodium, 0,001 % de ProClin[®] 150.
- **Tampon de lavage drastique**, prêt à l'emploi, contient 0,001 % de colorant, 0,1 % de dodécylsulfate de sodium, 0,001 % de ProClin[®] 150.
- **Tampon de lavage TBS** (Tris Buffered Saline), prêt à l'emploi, contient 20 mM de Tris, 0,003 % de colorants, 0,001 % de ProClin[®] 150.
- **Substrat BCIP[®]/NBT**, prêt à l'emploi (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate / chlorure de nitrobleu de tétrazolium).
- **Conjugué**, streptavidine marquée à la phosphatase alcaline, concentré, contient < 0,1 % d'azide de sodium (à diluer au 1:1 666[°] dans du tampon de blocage).

3.4 Définition des lots et des sous-lots

- **Trousse** : p. ex., **HISTO SPOT[®] A**, définit le locus analysé.
- **Lot** : p. ex., **A084, A085**, définit la spécificité des sondes contenues dans la trousse et leur position. Chaque lot peut comporter plusieurs sous-lots.
- **Sous-lot** : p. ex. **A085-1, A085-2, A085-3**, définit comment chaque sonde réagit par rapport aux sondes de contrôle (valeurs seuil), et définit la date de fabrication et de péremption des barrettes. Des sondes données peuvent être réparties dans plusieurs sous-lots au sein du même lot. Ces informations se situent sur le CD propre au lot fourni avec les trousse (fichier Excel des tableaux de correspondance).

3.5 Réactifs et équipements nécessaires mais non fournis

- Processeur MR.SPOT[®], [RÉF] 726100, ou processeur MR.SPOT[®] 2.0, [RÉF] 726110.
- Logiciel HISTO MATCH, [RÉF] 726102.
- Embouts de pipette pour le processeur MR.SPOT[®] (1 000 µl [RÉF] 726099 et 200 µl [RÉF] 726097).
- Réactifs pour l'extraction de l'ADN (éviter la technique du relargage au sel).
- Plaques de PCR à jupe et couvercles ou films associés (HISTO SPOT[®] PCR Frameplates, [RÉF] 726220, HISTO SPOT[®] PCR Caps, [RÉF] 726090, HISTO SPOT[®] PCR Foils, [RÉF] 726089).
- Thermocycleur.
- Eau désionisée.
- Pipettes à volume variable (gamme 0,5 – 1 000 µl) et embouts jetables.

4. CONSERVATION ET STABILITÉ

Les trousse sont expédiées à température ambiante. Après leur livraison, tous les réactifs et composants des trousse doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de chaque composant. Elle est valable pour les contenants non entamés. La date de péremption indiquée sur l'étiquette externe correspond à celle du composant de la trousse ayant la validité la plus courte. Les trousse de typage doivent être utilisées dans la configuration où elles ont été livrées (c'est-à-dire que le mélange initial et le chlorure de magnésium d'un lot ne doivent pas être utilisés pour un autre lot). Il est recommandé de conserver les composants des trousse de typage ensemble dans le coffret d'origine.

Il est possible d'entamer des barrettes individuelles de 8 cupules des trousse HISTO SPOT[®], HISTO SPOT[®] 4D, HISTO SPOT[®] Xtend et HISTO SPOT[®] *Coeliac Disease*, de détacher les cupules nécessaires pour une série d'analyse et de remettre les cupules restantes dans le sachet d'emballage ouvert pour être utilisées ultérieurement avec la trousse. Les cupules réactionnelles conservées dans des sachets ouverts sont à utiliser dans les 30 jours suivant l'ouverture. Il est recommandé d'inscrire la date d'ouverture sur le sachet. Les autres réactifs ouverts sont à utiliser dans les 3 mois. La dilution du conjugué doit toujours être préparée extemporanément pour chaque série de test.

5. PROTOCOLE

5.1 Précautions de sécurité et recommandations particulières

Les techniques de génétique moléculaire sont des méthodes particulièrement sensibles qui doivent être réalisées par du personnel bien formé, ayant l'expérience des techniques de génétique moléculaire et des tests d'histocompatibilité. Les résultats de ces tests ne doivent pas être utilisés comme seul déterminant pour prendre des décisions cliniques.

Les directives de transplantation ainsi que les normes EFI doivent être respectées, de manière à réduire le risque de typage erroné. Ceci est particulièrement important dans le cas de résultats discordants observés entre les méthodes de sérologie et de génétique moléculaire.

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 pour les tâches après l'amplification (hybridation et détection). De préférence, utiliser deux pièces différentes (zones pré-PCR et post-PCR).
- ◆ Les amplicons ne doivent pas être ramenés dans la zone de travail servant à la préparation de la PCR.
- ◆ Utiliser les dispositifs et autres matériels uniquement à leur place respective et veiller à ce qu'ils ne puissent pas être échangés.

5.2 Isolement de l'ADN

Le recours à une trousse d'extraction certifiée **CE** IVD pour l'isolement de l'ADN est fortement recommandé. La méthode standard utilisée par le laboratoire pour l'isolement de l'ADN doit être validée par l'utilisateur. Éviter dans toute la mesure du possible la technique du relargage au sel.

Méthodes validées pour l'extraction de l'ADN

- Colonnes Qiagen

Méthodes testées avec succès sur le terrain

- EZ-1 / Geno M6 (billes Qiagen)
- Promega Maxwell 16
- QuatroProbe (BeeRobotics)

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. Le typage HLA par le système HISTO SPOT[®] SSO requiert une concentration en ADN comprise entre 15 et 30 ng/μl.

L'indice de pureté doit respecter les critères suivants :

- Rapport d'extinction DO_{260}/DO_{280} : > 1,5 et < 2,0
Des valeurs plus élevées sont le signe de la présence d'ARN, des valeurs plus faibles, celui d'une contamination par des protéines.
- Rapport d'extinction DO_{260}/DO_{230} : > 1,8
Des valeurs plus faibles sont le signe d'une éventuelle contamination par des glucides, des sels ou des solvants organiques.

5.3 Amplification

5.3.1 Trousses HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend et HISTO SPOT® Coeliac Disease

Utiliser des plaques de PCR à jupe pour l'amplification, car elles doivent ensuite être maintenues au niveau de la jupe par un collier dans le processeur MR.SPOT®. Les plaques HISTO SPOT® PCR Frameplates ont été validées pour cette application, les plaques provenant d'autres fournisseurs doivent être validées par l'utilisateur. Pour chaque échantillon à amplifier, ajouter les réactifs suivants à chaque tube PCR.

10 µl Mélange initial
5 µl MgCl₂
5 µl Échantillon d'ADN (15-30 ng/µl)

Le volume total de chaque réaction d'amplification est de 20 µl.

Prémélange pour plusieurs échantillons :

Nb d'échantillons + 2	x 10 µl Mélange initial	} utiliser 15 µl de prémélange par échantillon
Nb d'échantillons + 2	x 5 µl MgCl ₂	

Remarque Il est important que la concentration en ADN soit comprise dans tous les échantillons entre 15 et 30 ng/µl. Des concentrations plus élevées peuvent conduire à des réactions de sonde faussement positives et des concentrations plus faibles peuvent entraîner des échecs d'amplification.

Pour réaliser un **contrôle négatif**, préparer une réaction PCR avec de l'eau distillée à la place de l'ADN échantillon.

Sceller les tubes d'amplification avec des couvercles ou un film adhésif et centrifuger brièvement le liquide. Les placer dans le thermocycleur et lancer l'amplification avec le programme de PCR détaillé au chapitre 5.3.3.

5.3.2 Trousse HISTO SPOT® On-Call Typing Kit

Pour chaque combinaison de tests, sortir du réfrigérateur une barrette PCR **PCR Primers** contenant déjà les amorces d'amplification.

Effectuer un prémélange pour chaque échantillon, avec les composants suivants.

80 µl Tampon PCR
40 µl MgCl₂
40 µl Échantillon d'ADN (15-30 ng/µl)

Distribuer 20 µl du prémélange dans chaque cupule contenant déjà les amorces et remettre en suspension les amorces à l'aide du prémélange.

Remarque Il est important que la concentration en ADN soit comprise dans tous les échantillons entre 15 et 30 ng/µl. Des concentrations plus élevées peuvent conduire à des réactions de sonde faussement positives et des concentrations plus faibles peuvent entraîner des échecs d'amplification.

Pour réaliser un **contrôle négatif** dans la cupule numéro 8 de la trousse **HISTO SPOT® On-Call Typing Kit**, préparer une réaction PCR avec de l'eau distillée à la place de l'ADN échantillon.

10 µl Tampon PCR
5 µl MgCl₂
5 µl H₂O

Sceller les tubes d'amplification avec les bouchons fournis et centrifuger brièvement le liquide. Les placer dans le thermocycleur et lancer l'amplification avec le programme de PCR détaillé au chapitre 5.3.3.

5.3.3 Programme de PCR

Étape de programme	Durée	Température	Nb de cycles
Première dénaturation	2 mn	96 °C	1 cycle
Dénaturation	15 s	96 °C	10 cycles
Hybridation + extension	60 s	65 C	
Dénaturation	10 s	96 °C	20 cycles
Hybridation	50 s	61 C	
Extension	30 s	72 C	
Maintien	∞	22 C	

Ces conditions sont identiques pour tous les thermocycleurs. Toutefois, le temps total nécessaire pour cette étape varie selon la « vitesse de rampe » de chaque modèle de thermocycleur.

Les modèles suivants de thermocycleurs ont été validés pour être utilisés avec les trousse HISTO SPOT® SSO.

Applied Biosystems : PE 9600, PE 9700 (vitesse de rampe du PE 9600), Veriti™

Biorad : PTC 100 / PTC 200, Mycycler

Eppendorf : Mastercycler EP Gradient S

En cas d'utilisation d'autres thermocycleurs, une validation doit être effectuée par l'utilisateur. De manière générale, il est recommandé de ne jamais utiliser une vitesse de rampe autre que 1 à 2 °C/seconde.

Une fois l'étape d'amplification terminée, les échantillons peuvent être analysés immédiatement ou conservés entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de 5 jours. Ne pas congeler les amplicons.

Il n'est pas nécessaire de réaliser un gel pour contrôler l'amplification. Cela est d'autant plus inutile que l'amplification peut être correcte, même si le gel ne présente qu'une bande très faiblement visible.

Si cependant il est prévu de réaliser un gel, ne pas utiliser plus de 2 à 3 µl d'amplicon. Les tailles des différents amplicons sont indiquées sur le CD d'information fourni avec chaque trousse (fichier Excel, tableau de correspondance, deuxième onglet intitulé « Notes »).

5.4 Hybridation automatisée sur le processeur MR.SPOT®

5.4.1 Préparation des réactifs

Sortir les réactifs HISTO SPOT® et les cupules réactionnelles HISTO SPOT® du réfrigérateur et les laisser se réchauffer à température ambiante.

Il est possible d'observer des cristaux de sel dans le tampon d'hybridation et dans la solution de lavage drastique. Dans ce cas, réchauffer les réactifs à 30 °C pour dissoudre les cristaux. Réchauffer tout le contenu du flacon et pas seulement un aliquote.

Le conjugué doit être dilué au 1:1 666^e dans du tampon de blocage. La dilution du conjugué doit toujours être préparée extemporanément à chaque série de test.

Le conjugué doit être mélangé au vortex et centrifugé chaque fois avant l'étape de dilution.

Les volumes nécessaires de réactifs varient selon le nombre de barrettes à utiliser. Le processeur MR.SPOT® affiche les volumes nécessaires pour le nombre de barrettes choisi. Verser les volumes nécessaires de réactifs dans les réservoirs marqués en conséquence.

Placer les cupules réactionnelles et la plaque PCR sur les blocs adaptés du processeur MR.SPOT®. Respecter le bon positionnement et la bonne orientation de la plaque PCR.

S'assurer également de l'absence de saleté ou de particules de plastique sur le support de la plaque réactionnelle, car celles-ci peuvent perturber le transfert de chaleur pendant l'hybridation.

Les barrettes issues des trousse HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend et HISTO SPOT® *Coeliac Disease* peuvent être scindées en cupules unitaires selon la figure 2, si le nombre de tests à réaliser est inférieur à 8. Lors de l'utilisation de cupules scindées, il est important de s'assurer de leur bon positionnement dans le support de plaque réactionnelle et d'éviter qu'elles ne soient tordues les unes contre les autres.

Kommentar [VF1]: Renumerotation des figures

Veiller à placer des cupules factices dans les positions vides pour atteindre un multiple de quatre lors de l'utilisation de cupules unitaires ou de barrettes combistrip.

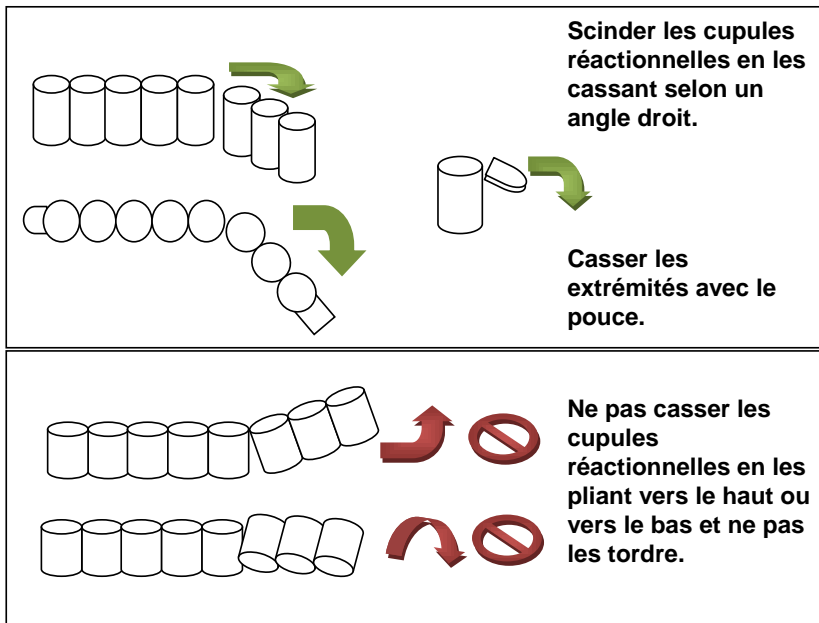


Figure 2. Séparation de cupules réactionnelles unitaires.

5.4.2 Démarrage du processeur MR.SPOT®

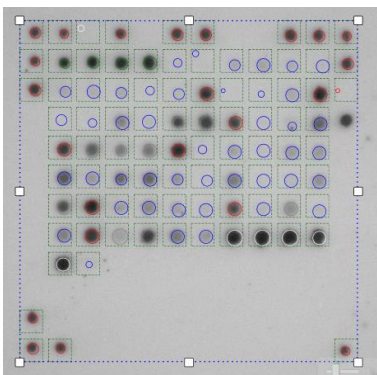
Mettre sous tension le processeur MR.SPOT®. L'écran de démarrage s'affiche. Suivre les instructions indiquées à l'écran. Pour obtenir des détails, consulter le mode d'emploi du processeur MR.SPOT®.

Remarque : éviter d'exposer le processeur MR.SPOT® et les réactifs associés au soleil.

5.4.3 Transfert des images sur un PC pour l'interprétation

Transférer les données au logiciel HISTO MATCH par l'intermédiaire du réseau ou d'une clé USB, selon la description dans le manuel du logiciel HISTO MATCH.

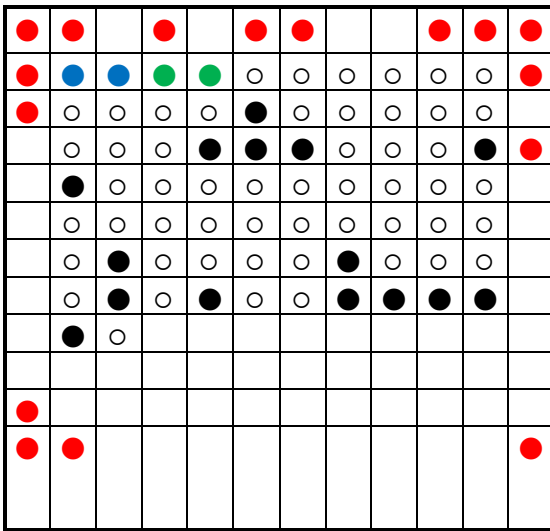
5.4.4 Interprétation des images



Ouvrir le logiciel HISTO MATCH (si celui-ci n'est pas déjà installé, il peut l'être à partir du CD livré avec le processeur MR.SPOT®) et interpréter les données selon la description dans le manuel du logiciel HISTO MATCH.

Les images doivent ressembler à l'exemple présenté à la figure 3. La figure 4 donne une illustration schématique de l'image type obtenue et des fonctions des différentes sondes. La couleur des cercles autour des sondes indique leur fonction (consulter la notice utilisateur du logiciel HISTO MATCH pour obtenir de plus amples détails).

Figure 3. Image d'un résultat pour le HLA A



● : sondes de position, qui réagissent avec les amorces d'amplification dans le mélange initial. Elles indiquent que le mélange initial est bien présent et que tous les réactifs ont été correctement distribués pendant l'analyse SSO. Par ailleurs, elles permettent au logiciel de positionner l'image. Le schéma correspond à un sous-lot.

●+● : contrôles d'amplification pour les exons 2 et 3, traités en double. Ces sondes sont universelles pour tous les allèles du locus concerné, et elles indiquent ainsi la réussite de la PCR. Elles ont également pour fonction de fixer le seuil pour les sondes spécifiques d'allèle.

● : sonde spécifique d'allèle, signal positif.

○ : sonde spécifique d'allèle, signal négatif.

Figure 4. Illustration schématique de l'image et de la fonction des sondes

6. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Le processeur HISTO SPOT[®] est conçu pour une utilisation de diagnostic *in vitro* et doit être manipulé par du personnel qualifié et formé. Toute utilisation doit respecter les bonnes pratiques de laboratoire.

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., 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).

Le tampon de blocage, le tampon d'hybridation, le tampon de lavage drastique et le tampon de lavage TBS contiennent du ProClin[®] 150, et la solution de chlorure de magnésium contient du ProClin[®] 300. La concentration en conservateur dans les réactifs est seulement de 0,001 %. Éviter toutefois le contact avec la peau et les membranes muqueuses.

Le mélange initial et le conjugué contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Les réactifs contiennent une concentration < 0,1 % d'azide de sodium, qui n'est pas considérée comme dangereuse. Éviter toutefois le contact avec la peau et les membranes muqueuses. L'azide de sodium peut réagir avec les tuyauteries de plomb et de cuivre et former des azides métalliques explosifs. Au moment d'éliminer les solutions contenant de l'azide de sodium dans les éviers de laboratoire, rincer les tuyauteries avec de grandes quantités d'eau pour éviter la formation d'azide.

Toute la manipulation avec les réactifs doit être réalisée en respectant les précautions adaptées. Porter une protection oculaire, une blouse de laboratoire et des gants jetables pour manipuler les réactifs. Éviter le contact de ces produits avec la peau, les yeux et les membranes muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement avec une grande quantité d'eau. Sinon, une brûlure pourrait se produire.

Si des réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant de les éponger. Ne pas exposer le substrat aux métaux ni aux agents oxydants.

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

Éviter la contamination microbienne des réactifs au moment de prélever un aliquote dans les flacons. L'utilisation de pipettes et d'embouts de pipettes stériles jetables est recommandée. Ne pas utiliser de réactifs présentant une turbidité ou une contamination microbienne apparente.

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

7. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DES PERFORMANCES

7.1 Évaluation

Toutes les trousse HISTO SPOT® SSO ont été évaluées avec des échantillons d'ADN de typage connu. Les résultats ont été comparés à ceux d'autres méthodes de typage (ex. : SSP, séquençage). Aucune discordance n'a été observée entre les méthodes de typage. Pour chaque lot, la spécificité de chaque sonde a été vérifiée à l'aide d'ADN d'échantillons de référence.

7.2 Réaction d'amplification PCR

Les allèles amplifiés par chaque trousse HISTO SPOT® SSO, la version de la nomenclature HLA et les exons amplifiés sont indiqués avec les informations spécifiques du lot respectif. Ces informations sont rassemblées sur un CD fourni avec chaque trousse.

8. LIMITES DE LA MÉTHODE

En raison de la grande sensibilité de l'analyse par PCR aux variations de concentration et de qualité de l'ADN, les échantillons d'ADN utilisés doivent avoir une concentration comprise entre 15 et 30 ng/µl et un indice de pureté approprié (rapport d'extinction DO_{260}/DO_{280} compris entre 1,5 et 2,0 / rapport d'extinction $DO_{260}/DO_{230} > 1,8$).

Un soin particulier doit être pris pour éviter la contamination des réactifs de la trousse et des autres produits et équipements de laboratoire avec des amplicons ou de l'ADN. Il est fortement recommandé de réaliser régulièrement des tests de contamination (ex. : BAG Wipe Test, **RÉF** 7091) et d'utiliser des contrôles négatifs dans chaque série d'analyse.

L'hybridation est un procédé très sensible à la température. De ce fait, les trousse HISTO SPOT® SSO ne doivent être utilisées qu'en association avec le processeur MR.SPOT® pour assurer des températures et temps d'incubation valides.

Tous les instruments (p. ex., pipettes, thermocycleurs, blocs chauffants, processeur MR.SPOT®) doivent être étalonnés conformément aux instructions des fabricants. L'exactitude et l'uniformité de température du thermocycleur peuvent être testées avec le test BAG CycloCheck (**RÉF** 7104, 71044).

9. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Le contrôle qualité interne des nouveaux lots de trousse HISTO SPOT® SSO peut être réalisé à l'aide d'un « panel maison » d'échantillons d'ADN de type HLA connu.

Chaque cupule réactionnelle renferme des contrôles positifs internes pour vérifier la réussite des réactions d'amplification et d'hybridation.

Il est recommandé d'utiliser des contrôles négatifs pour détecter d'éventuelles contaminations. Préparer une réaction PCR sans ADN et l'utiliser dans la réaction ultérieure d'hybridation comme contrôle négatif.

10. GESTION DES INCIDENTS

Symptôme	Problème(s) possible(s)	Solution(s) éventuelle(s)
Dysfonctionnement de l'instrument	Nombreux	Consulter le manuel utilisateur du processeur MR.SPOT®
Message d'erreur au transfert de données	Échec de transfert des données	Transférer les données manuellement avec une clé USB
Aucun résultat	Erreur d'adressage	Réaliser l'adressage manuellement
Aucun point dans la cupule	Mélange initial non ajouté à la PCR	Recommencer toute l'analyse et vérifier le produit PCR sur gel
Seuls les points de contrôle sont positifs	ADN non ajouté à la PCR ou échec de l'amplification	Recommencer toute l'analyse et vérifier le produit PCR sur gel
Sondes faussement positives	Utilisation d'une quantité d'ADN trop importante ou conjugué trop concentré (non centrifugé)	Vérifier la concentration en ADN. Centrifuger le conjugué avant son utilisation.
Absence d'amplification de l'exon	Concentration en ADN trop élevée ou ADN dégradé	Vérifier la concentration en ADN, tester l'ADN sur gel
Aucun résultat ou résultat non concluant en raison de signaux faibles	Erreur de dilution du conjugué ou amplification faible Dysfonctionnement de l'instrument	Recommencer l'analyse. Vérifier la température d'hybridation sur l'instrument.








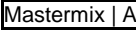
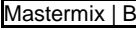
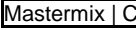
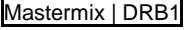
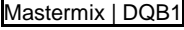
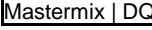
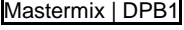
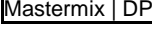
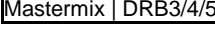
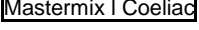

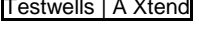
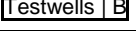
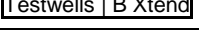
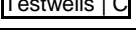
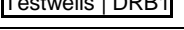
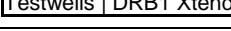
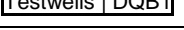
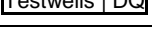
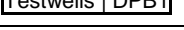
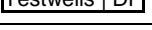
11. MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT

ProClin® est une marque commerciale de l'entreprise Rohm and Haas.

BCIP® est une marque commerciale de Sigma Aldrich Co.

Veriti™ est une marque commerciale d'Applied Biosystems.

12. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS SUR LES EMBALLAGES

	Pour usage de diagnostic <i>in vitro</i>
	Température de conservation
	N° de lot
	Date de péremption
	Code produit
	Consulter la notice utilisateur
	Destiné au typage HLA
	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-A
	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-B
	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-C
	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-DRB1
	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-DQB1
	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-DQB1 et DQA1
	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-DPB1
	Mélange initial pour l'amplification du locus HLA-DPB1 et DPA1
	Mélange initial pour l'amplification des loci HLA-DRB3/4/5
	Mélange initial pour l'amplification des loci spécifiques
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-A
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-A
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-B
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-B
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-C
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-DRB1
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-DRB1
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-DQB1
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-DQB1 et DQA1
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-DPB1
	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer le locus HLA-DPB1 et DPA1

Testwells DRB3/4/5	Cupules réactionnelles avec sondes fixées pour typer les loci HLA-DRB3/4/5
Testwells Coeliac	Cupules réactionnelles avec des sondes fixées pour typer les allèles spécifiques
Combistrip	Cupules réactionnelles avec des sondes fixées pour typer plusieurs loci HLA
PCR Primers	Barrettes PCR avec des amorces séchées pour l'amplification de plusieurs loci HLA
PCR Caps	Bouchons PCR
PCR Buffer	Tampon PCR
MgCl₂	Solution de chlorure de magnésium
BLOCKBUF	Tampon de blocage
HYBBUF	Tampon d'hybridation
STRGWASH	Tampon de lavage drastique
TBSWASH	Tampon de lavage TBS (Tris Buffered Saline)
SUBS	Substrat BCIP [®] / NBT
CONJ	Conjugué, streptavidine marquée à la phosphatase alcaline
HISTO SPOT[®] INFORMATION CD	CD contenant la notice utilisateur, le fichier de lot spécifique du sous-lot, le tableau de correspondance et des informations sur les sondes

13. BIBLIOGRAPHIE

Mack S.J. et al., Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue, Tissue Antigens 81/4, 183-257 (2013)

Megiorni and Pizzuti, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing Journal of Biomedical Science 19:88 (2012)

**Pour les notices utilisateur en d'autres langues, consulter <http://www.bag-healthcare.com>
<http://service.bag-healthcare.com> ou téléphoner au +49 (0)6404-925-125**