

FR

Notice utilisateur

HISTO TYPE B*27 Q

Trousse 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

**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.**

REF 728200

HISTO TYPE B*27 Q

CE 0123

Table des matières

1. DESCRIPTION DU PRODUIT	2
2. PRINCIPE DU TEST	2
3. MATÉRIEL	2
3.1 Contenu de la trousse HISTO TYPE B*27 Q	2
3.2 Réactifs et dispositifs supplémentaires requis	2
3.3 Thermocycleurs et tubes réactionnels validés	3
4. CONSERVATION ET STABILITÉ	3
5. PROTOCOLE	3
5.1 Précautions de sécurité et recommandations particulières	3
5.2 Isolement de l'ADN	4
5.3 Amplification	4
5.4 Interprétation des résultats	5
6. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	6
7. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DES PERFORMANCES	6
8. LIMITES DE LA MÉTHODE	7
9. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE	7
10. GESTION DES INCIDENTS	8
11. MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT	9
12. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS SUR LES EMBALLAGES	9
13. BIBLIOGRAPHIE	9

Distribué en Belgique, en France et au Luxembourg par :

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

Version 01/2018 / Édition : 03-2018

1. DESCRIPTION DU PRODUIT

La trousse HISTO TYPE B*27 Q est utilisée pour la détection des allèles HLA-B*27 par méthode de génétique moléculaire. La protéine HLA-B27 est un variant de l'antigène leucocytaire humain B (HLA-B). La protéine HLA-B27 est associée à plusieurs maladies auto-immunes (maladie de Bechterew ou spondylarthrite ankylosante, maladie de Reiter, arthrite réactive) et elle est par conséquent utile dans le cadre d'une procédure de diagnostic (1, 2). Un résultat HLA-B27 positif est associé à un risque très élevé de maladie. Dans les cas de suspicion de maladie de Bechterew, le diagnostic de l'allèle HLA-B*27 apporte une contribution importante au traitement du patient. Environ 3 % à 6 % des personnes porteuses du gène HLA-B*27 développent une spondylarthrite ankylosante et plus de 90 % de tous les patients présentant une arthrite séronégative sont porteurs de ce gène.

La trousse **HISTO TYPE B*27 Q** couvre tous les sous-types fréquents de l'allèle HLA-B*27. De plus, la trousse fait la distinction entre les allèles associés à la maladie et les sous-types HLA-B*27:06 ou HLA-B*27:09, qui ne sont pas associés à la spondylarthrite ankylosante (3).

2. PRINCIPE DU TEST

Le matériel de départ du test est l'ADN génomique. L'ADN est amplifié par PCR avec des amorces spécifiques de séquence (SSP). Les amorces ont été développées spécifiquement pour l'amplification sélective des exons 2 et 3 du gène HLA-B*27 et reconnaissent uniquement les sous-types B*27. Les amplicons sont détectés par des sondes d'hydrolyse spécifiques du locus, marquées par un colorant fluorescent (sondes TaqMan®), ce qui améliore la sensibilité et la spécificité diagnostiques du test par rapport à une SSP conventionnelle.

En présence d'amplicons, les sondes sont hydrolysées par la Taq polymérase et génèrent un signal fluorescent proportionnel à la quantité de produit PCR. Les signaux fluorescents sont mesurés par l'unité de détection optique du thermocycleur RT-PCR.

Le test comporte une seule réaction PCR qui détecte le contrôle positif interne (gène humain HBB), les sous-types associés à la maladie et les sous-types non associés à la maladie par différentes couleurs de fluorescence.

3. MATÉRIEL

3.1 Contenu de la trousse HISTO TYPE B*27 Q

- **230 µl mélange d'amorces B27 Q**, prêt à l'emploi, contient les amorces et les sondes
- **230 µl mélange initial Q**, prêt à l'emploi, contient les dNTP, la Taq polymérase et le tampon de réaction
- **Notice utilisateur**

3.2 Réactifs et dispositifs supplémentaires requis

- Réactifs pour l'isolement de l'ADN (voir les trousse d'isolement de l'ADN validées au chapitre 5.2)
- Thermocycleur PCR en temps réel (voir les thermocycleurs validés au chapitre 3.3)
- Tubes réactionnels pour RT-PCR avec capuchons ou films (voir les produits validés au chapitre 3.3)
- Eau distillée
- Pipettes à piston (0,5 à 1 000 µl) et embouts

3.3 Thermocycleurs et tubes réactionnels validés

Thermocycleur	Vers. logiciel	Tubes réactionnels pour RT-PCR	Systèmes de fermeture pour RT-PCR
Système de détection de PCR en temps réel CFX96™ Bio-Rad	3.1.1517.0823.	Plaque PCR FrameStar® Break-A-Way, 96 cupules transparentes, cadre transparent, réf. 4ti-1200/C 4titude	Barrettes 4titude Crystal, réf. 4ti-0755 4titude
		Plaques PCR 96 cupules Hard-Shell®, profil bas, paroi fine, à jupe, blanc/blanc #HSP9655 Bio-Rad	Tube PCR à fond plat de 0,2 ml Barrette de 8 capuchons, optique, ultra-transparente #TCS0803 Bio-Rad
Système LightCycler® 480 Roche	LCS480 1.5.0.39	Plaque 96 cupules pour LightCycler® 480, blanche réf. 04729692001 Roche	Film étanche pour LightCycler® 480 réf. 04729757001 Roche

Remarque spécifique

En cas d'utilisation d'autres thermocycleurs en temps réel, les tubes réactionnels et les systèmes de fermeture doivent être validés par l'utilisateur.

4. CONSERVATION ET STABILITÉ

Les trousse sont expédiées avec des blocs réfrigérants. À réception, conserver tous les réactifs dans des dispositifs contrôlés en température à ≤ -20 °C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de chaque réactif. La date de péremption indiquée sur l'étiquette externe correspond au réactif ayant la validité la plus courte dans la trousse. L'analyse du cycle de congélation-décongélation a montré que 15 cycles n'affectent pas la qualité de la trousse.

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 de ces techniques. Les résultats de ces tests ne doivent pas être utilisés comme seul déterminant pour prendre des décisions cliniques. 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 à chaque étape de pipetage (avec un filtre intégré).
- ◆ Utiliser si possible des zones de travail séparées pour les tâches avant l'amplification (isolement de l'ADN et préparation de la PCR) et pour les tâches après l'amplification (détection).
- ◆ 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

L'échantillon pour l'isolement d'ADN génomique doit être prélevé dans des dispositifs adaptés au recueil du sang. Le test requiert du sang recueilli sur EDTA ou sur citrate. La présence d'héparine peut inhiber la PCR. Par conséquent, les dispositifs de recueil de sang contenant de l'héparine ne sont pas adaptés (4) et ne doivent pas être utilisés.

Il est recommandé d'utiliser des trousse certifiées **CE IVD** pour l'isolement de l'ADN.

Trousses d'isolement de l'ADN validées

- Trousse Qiagen QIAamp DNA Blood Kit (colonne)
- Trousse Chemagic™ 360 (billes)
- EXTRA-GENE I (méthode de relargage au sel)

Si la méthode habituelle d'isolement d'ADN génomique utilisée dans le laboratoire ne figure pas dans la liste des trousse validées ci-dessus, celle-ci doit être validée par l'utilisateur.

Le test HISTO TYPE B*27 Q requiert une concentration en ADN comprise entre 10 et 150 ng/μl.

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

- $DO_{260}/DO_{280} = > 1,5 \text{ et } < 2,0$
Des valeurs plus élevées indiquent une contamination par de l'ARN, des valeurs plus faibles indiquent une contamination par des protéines.
- $DO_{260}/DO_{230} = > 1,8$
Des valeurs plus faibles indiquent une contamination par des sels, des glucides ou des solvants organiques.

5.3 Amplification

Utiliser les tubes réactionnels recommandés par le fabricant du thermocycleur en temps réel ou les matériels recommandés dans le chapitre 3.3.

Pour chaque échantillon, distribuer les réactifs suivants dans un tube réactionnel :

- 2 μl** mélange d'amorces Q
- 2 μl** mélange initial Q
- 1 μl** échantillon d'ADN (10 à 150 ng/μl)
- 5 μl** eau distillée

Le volume de réaction pour chaque test Q-PCR est de 10 μl.

En cas de préparation d'un prémélange composé d'amorces Q, de mélange initial Q et d'eau distillée pour plus d'un échantillon, prévoir une quantité supplémentaire raisonnable tenant compte des pertes au pipetage. Pour réaliser un **contrôle négatif (NTC)**, préparer une réaction PCR avec de l'eau distillée à la place de l'ADN.

Fermer les tubes réactionnels et centrifuger brièvement le liquide. Vérifier l'absence de bulles dans les cupules. Si des bulles sont observées, tapoter doucement sur la paillasse pour les enlever.

Démarrer le programme PCR avec les paramètres suivants.

Étape	Durée	Température	Nb de cycles
Activation initiale	10 min	96 °C	1 cycle
Dénaturation	20 sec	96 °C	40 cycles
Hybridation + extension	40 sec + lecture	64 °C	

Les thermocycleurs suivants ont été validés pour la trousse HISTO TYPE B*27 Q.

- Biorad : système CFX96™ de détection PCR en temps réel
- Roche : système LightCycler® 480

Remarque particulière

Pour le système LightCycler® 480, la vitesse de montée en température (*ramp rate*) doit être réglée à 4,4 °C/sec. pour la dénaturation et à 2,2 °C/sec. pour les étapes d'hybridation et d'extension. Il faut également veiller à ce qu'une compensation de couleur (*colour compensation*) soit réalisée au préalable.

Pour le système CFX96™ de détection PCR en temps réel, utiliser les paramètres par défaut.

Si d'autres thermocycleurs en temps réel sont utilisés, ils doivent être validés par l'utilisateur.

5.4 Interprétation des résultats

Tous les tests réalisés sur de l'ADN génomique humain doivent présenter un signal de fluorescence dans le canal jaune, produit par le contrôle interne. Les échantillons positifs pour l'allèle HLA B*27 présentent un signal positif dans le canal vert. Le canal rouge donne un signal positif avec les allèles B*27:06 et B*27:09, détectés indépendamment.

Canal	Spécificité
Vert (B*27 positif)	B*27:01-17,19-21,24-28,30-47,76-84,86-156,158-164
Rouge (B*27:06, B*27:09 positif)	B*27:06,09 #

les allèles suivants ne peuvent pas être exclus : B*27:91,106,136,154 cependant ces allèles sont extrêmement rares

Les signaux d'amplification pour les contrôles négatifs (négatif pour le B*27) doivent se situer en dehors des valeurs de Cq définies pour les deux canaux (vert et rouge). Un contrôle négatif à l'eau distillée ne doit présenter aucun signal fluorescent pendant toute la série de PCR Q et constitue un contrôle de contamination.

Les signaux suivants sont considérés positifs :

	Canal	Seuil prédéfini	Niveau Cycles	LDD Cycles	Lambda en nm
Contrôle positif interne	Jaune (VIC)	15	21	29	Excitation : 538 Émission : 554
B*27 positif	Vert (FAM)	50	27	35	Excitation : 495 Émission : 520
B*27:06 positif, B*27:09 positif	Rouge (Texas Red)	50	23	31	Excitation : 597 Émission : 616

Remarque particulière

Le seuil prédéfini doit être utilisé uniquement pour l'association d'un thermocycleur CFX96 et de tubes réactionnels PCR transparents. En cas d'utilisation de tubes réactionnels PCR blancs, le calcul automatique du seuil du logiciel concerné doit être appliqué.

Le **Niveau Cq** est le cycle PCR qui présente une détection positive par rapport au bruit de fond.

La **LDD Cq** est le dernier cycle PCR qui peut être classé correctement en détection positive par rapport au bruit de fond.

6. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

La trousse HISTO TYPE B*27 Q est conçue pour une utilisation de diagnostic *in vitro* et doit être manipulée uniquement par du personnel qualifié et correctement formé. Toutes les manipulations doivent respecter les bonnes pratiques de laboratoire.

Les produits biologiques utilisés pour l'extraction de l'ADN, tels que le sang, doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses. Il est donc recommandé de respecter des 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 immédiatement éliminé avec du papier absorbant, et les zones contaminées doivent être nettoyées avec un désinfectant classique 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 respecter les réglementations nationales, régionales et locales.

Éviter une contamination microbienne des réactifs lors du prélèvement d'aliquotes. Il est recommandé d'utiliser des pipettes et des embouts stériles à usage unique. Les réactifs troubles ou qui présentent des signes de contamination microbienne ne doivent pas être utilisés.

La Fiche de Données de Sécurité (FDS) peut être téléchargée à l'adresse www.bag-healthcare.com.

7. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DES PERFORMANCES

L'association des amorces et des sondes garantit une identification fiable des allèles B*27 précisés au chapitre 5.4. L'exactitude et la reproductibilité de la spécificité de la trousse de test sont vérifiées pour chaque lot à l'aide d'échantillons de référence typés au préalable.

L'étude d'évaluation des performances de la trousse HISTO TYPE B*27 Q a porté sur un total de 126 échantillons d'ADN typés au préalable. Les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus avec d'autres réactifs de typage certifiés CE (entre autres sérologie, SSO, SSP) et/ou par séquençage.

Aucune discordance de détection de la caractéristique B*27 n'a été observée (concordance à 100 %)

Échantillons d'ADN	Nombre total (étude interne & externe)	Total étude interne	Total étude externe	Concordance (%)
B27 négatif	101	74	27	100
B27 positif	25	21	4	100
Total	126	95	31	100

Tableau : Résumé des résultats de l'étude interne et de l'étude externe avec le pourcentage de concordance par rapport au typage de référence et à la détection de l'allèle B*27

8. LIMITES DE LA MÉTHODE

Du fait de la grande sensibilité aux contaminations croisées de la méthode de Q-PCR, un soin particulier doit être pris pendant l'isolement de l'ADN. Les tests de validation réalisés au cours de l'étude d'évaluation des performances de la trousse HISTO TYPE B*27 Q ont montré qu'une variation de quantité de l'ADN utilisé pour l'amplification entre 10 ng et 150 ng n'a pas d'influence significative sur la détection des allèles B*27.

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

Le contrôle négatif avec de l'eau distillée ne doit présenter aucun signal de fluorescence ($C_q > S.O.$). En présence d'un signal dans le contrôle négatif (canal jaune), la paillasse PCR doit être décontaminée et les réactifs doivent être remplacés si nécessaire.

Tous les instruments (par ex., pipettes, thermocycleurs en temps réel) doivent être étalonnés conformément aux instructions des fabricants.

9. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Le contrôle qualité interne des nouveaux lots de trousse HISTO TYPE B*27 Q peut être réalisé avec une association d'échantillons d'ADN de type HLA connu. Le mélange d'amorces Q contient un contrôle positif interne pour vérifier la réussite de l'amplification. Il est recommandé d'utiliser des contrôles négatifs pour détecter d'éventuelles contaminations. Préparer une réaction PCR sans ADN (NTC) à cette fin.






10. GESTION DES INCIDENTS

Symptôme	Raison possible	Solution possible
Signal faible ou absent	Présence d'un inhibiteur	Utiliser de nouveaux réactifs
	Réaction ne contenant pas d'ADN génomique	Recommencer le test Veiller au pipetage correct
	Paramètres d'amplification incorrects	Vérifier le programme PCR et la vitesse de montée en température
	ADN contaminé ou dégradé	Vérifier la concentration et la qualité de l'ADN Vérifier l'ADN sur un gel Recommencer l'isolement de l'ADN
	Sondes fluorescentes ou amorces dégradées	Utiliser un nouveau mélange d'amorces Q Éviter l'exposition à la lumière et les congélations et décongélations répétées Respecter les conditions de stockage
	Présence de bulles dans la réaction PCR, reste de liquide sur la paroi interne du tube	Soigner le pipetage Centrifuger la plaque PCR
	Matériel en plastique de mauvaise qualité ou incompatible avec la qPCR	Utiliser des matériels en plastique compatibles et de bonne qualité (voir le chapitre 3.3)
	Calcul du signal erroné en raison de signaux d'amplification anormaux pendant les premiers cycles de la série	Application de mesures correctives dans le logiciel (par ex., fonction Bio-Rad « Appliquer une correction de dérive de fluorescence » ou exclusion des cinq premiers cycles de l'analyse)
Présence d'un signal dans le contrôle négatif	Contamination du contrôle négatif par de l'ADN	Repréparer le contrôle négatif Décontaminer la paillasse

11. MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT

TaqMan® est une marque commerciale de Roche Molecular Systems Inc.

12. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS SUR LES EMBALLAGES

	Suffisant pour n tests
	Température de conservation / Limite inférieure de température
	Date de péremption
	Consulter la notice utilisateur
	Fabricant
HLA TYPING	Usage prévu : typage HLA
IFU	Notice utilisateur
IVD	Pour usage de diagnostic <i>in vitro</i>
LOT	N° de lot
Q Primermix B27	Mélange d'amorces pour le typage HLA B*27 avec la trousse HISTO TYPE B*27 Q
Q Mastermix	Mélange initial pour la trousse HISTO TYPE B*27 Q
RÉF	Code produit

13. BIBLIOGRAPHIE

1. Brewerton, DA. et al., 1973. Lancet i:904-907
2. Schlosstien, L. et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706
3. Kahn, MA. et al., 2007. Autoimmunity Reviews 6: 183–189
4. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

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