

Notice utilisateur

Trousse HISTO SPOT[®] Coeliac Disease

Trousse de test pour le typage des allèles HLA associés à la maladie cœliaque par méthode de génétique moléculaire

48 typages



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 726071 : HISTO SPOT[®] Coeliac Disease

Version : 1 / 2012

REF 726098 : HISTO SPOT[®] Reagent kit

Table des matières

1.	DESCRIPTION DU PRODUIT	2
1.1	Introduction et contexte	2
2.	PRINCIPE DU TEST	3
3.	MATÉRIEL.....	4
3.1	Réactifs fournis avec la trousse HISTO SPOT [®] Coeliac Disease	4
3.2	Réactifs fournis avec la trousse HISTO SPOT [®] Reagent Kit.....	4
3.3	Réactifs et équipements nécessaires mais non fournis	5
4.	CONSERVATION ET STABILITÉ.....	5
5.	PROTOCOLE	5
5.1.	Précautions et recommandations.....	5
5.2	Isolement de l'ADN	6
5.3	Amplification de l'ADN	6
5.4	Hybridation & Détection automatisées sur MR.SPOT [®]	7
5.4.1	Préparation des réactifs nécessaires	7
5.4.2	Démarrage du processeur MR.SPOT [®]	8
5.4.3	Transfert des images sur un PC pour l'interprétation.....	8
5.4.4	Interprétation des images à l'aide du logiciel HISTO MATCH	8
6.	PRÉCAUTIONS ET TRAITEMENT DES DECHETS.....	9
7.	CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES	10
7.1	Évaluation des performances	10
7.2	Amplifications par PCR	10
7.3	Résolution de la technique.....	10
8.	LIMITES DE LA MÉTHODE.....	10
9.	CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE	11
10.	GESTION DES INCIDENTS	12
11.	MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES.....	12
12.	EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS.....	13

Distribué en Belgique, en France et au Luxembourg par :

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

1. DESCRIPTION DU PRODUIT

La trousse HISTO SPOT® Coeliac Disease est un test de diagnostic *in vitro* pour le typage, par méthode de génétique moléculaire des allèles HLA associés à la maladie cœliaque. Les résultats de typage ont une résolution moyenne à élevée.

Le processeur HISTO SPOT® SSO est composé des trousse de typage HISTO SPOT®, de la trousse de réactifs 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 de détection des produits PCR, contenant des sondes immobilisées d'oligonucléotides spécifiques de séquence. La trousse de réactifs 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. Il automatise l'analyse depuis l'hybridation et la détection jusqu'à l'interprétation des résultats. Le logiciel HISTO MATCH est nécessaire à l'interprétation des résultats.

1.1 Introduction et contexte

La maladie cœliaque (MC) est un trouble génétique qui touche les enfants et les adultes (des deux sexes). Elle peut apparaître à tout âge, depuis l'enfance (dès que les céréales sont introduites dans l'alimentation) jusqu'à un âge avancé (même si la personne consommait régulièrement des céréales).

Les patients atteints de MC ne doivent pas manger d'aliments contenant du gluten, un composé présent dans le blé, le seigle, l'orge et d'autres céréales. En effet, le gluten déclenche chez eux une réaction auto-immune qui entraîne la destruction des villosités dans l'intestin grêle. Les patients produisent des anticorps qui touchent l'intestin, entraînant des lésions et une pathologie (p. ex., fatigue, carence alimentaire).

L'apparition de la maladie semble nécessiter deux composants, une prédisposition génétique et un déclencheur. Le déclencheur peut être de type environnemental (comme une surexposition au blé), lié à une situation (stress sévère), physique (comme une grossesse ou une intervention chirurgicale) ou pathologique (infection virale).

Il existe des preuves nettes en faveur d'une tendance familiale de la maladie cœliaque. En effet, 5 à 10 % des parents au premier degré (parents, enfants, frères et sœurs) des personnes atteintes de MC peuvent développer la maladie. Par conséquent, il est important de poser rapidement un diagnostic fiable pour mettre en place un traitement précoce.

Comme indiqué ci-dessus, la MC survient uniquement chez des personnes présentant une prédisposition génétique. Le patrimoine génétique de la maladie cœliaque est fortement associé au génotype HLA-DQA1*05-DQB1*02 (HLA-DQ2) et génotype HLA-DQA1*03-DQB1*0302 (HLA-DQ8). Ces allèles servent de station d'accueil aux auto-anticorps de la maladie cœliaque.

Plus de 90 % des personnes atteintes de la maladie cœliaque portent l'un de ces allèles, le DQ2 ou le DQ8 (par rapport à 25 % dans la population globale).

Par conséquent, la détection en génétique moléculaire des génotypes de HLA-DQ2 et de HLA-DQ8 est un outil extrêmement utile pour le diagnostic de la maladie cœliaque.

Quand un patient présentant un dysfonctionnement gastro-intestinal ne dispose pas du marqueur DQ2 ou DQ8, on peut quasiment exclure la maladie cœliaque.

2. PRINCIPE DU TEST

Le test est divisé en quatre étapes de base.

- Isolement de l'ADN
- Amplification 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 réaction PCR spécifique du locus en utilisant le mélange initial et la solution au MgCl₂ fournis dans la trousse. La spécificité de l'amplification est obtenue par un ensemble d'amorces biotinylées, conçues pour amplifier uniquement le locus HLA retenu. Après le processus d'amplification PCR, la plaque PCR contenant l'amplicon marqué à la biotine est transférée au processeur Mr.SPOT®. Le processeur MR.SPOT® ajoute le tampon d'hybridation à chaque puits et transfère chaque mélange amplicon + tampon d'hybridation dans une cupule réactionnelle contenant une biopuce de sondes immobilisées d'oligonucléotides spécifiques de séquence (SSO, sequence-specific oligonucleotide). Ces sondes sont soit de simples sondes d'oligonucléotides, soit une association d'au moins 2 sondes individuelles, immobilisées dans le même spot (sonde mosaïque), conçues pour améliorer l'identification des polymorphismes situés en cis.

L'amplicon marqué à la biotine se fixe aux sondes SSO qui contiennent une séquence cible complémentaire et il peut ensuite être détecté par réaction colorimétrique. Pour éviter la fixation non spécifique de l'amplicon à la surface des cupules réactionnelles, le système MR.SPOT® bloque les puits avec du tampon de blocage avant de transférer l'amplicon.

Après une étape de lavage drastique pour éliminer tout l'amplicon non fixé, un conjugué marqué à la streptavidine et à la phosphatase alcaline est ajouté aux cupules et se fixe sur les amplicons marqués la biotine capturés par la sonde SSO. 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 MR.SPOT® et l'image est transmise au logiciel HISTO MATCH installé sur le PC de l'utilisateur. Le programme d'analyse d'image du logiciel HISTO MATCH détermine l'intensité de chaque spot de la biopuce et la compare à l'intensité du fond. À partir de ces données, les réactions positives et négatives sont déterminées. Le programme de

correspondance de schéma du logiciel HISTO MATCH détermine le type HLA de l'échantillon en fonction du schéma d'hybridation spécifique.

3. MATÉRIEL

3.1 Réactifs fournis avec la trousse HISTO SPOT® Coeliac Disease

Les réactifs d'une trousse sont en quantité suffisante pour réaliser 48 tests. Chaque trousse de réactifs contient les éléments suivants :

Testwells I Coeliac	Cupules réactionnelles , emballées individuellement, chaque barrette contenant 8 tests, contient des sondes immobilisées d'oligonucléotides spécifiques de séquence	6 barrettes
Mastermix I Coeliac	Mélange initial , prêt à l'emploi, contient des amorces biotinylées, dNTP, Taq polymérase, tampon de réaction, 0,05 % d'azide de sodium	650 µl
MgCl2	Chlorure de magnésium , 6 mM, prêt à l'emploi, contient 0,001 % de Proclin® 300	600 µl

Chaque trousse est livrée avec un **CD** comportant le fichier de sous-lot relatif aux sondes présentes sur les biopuces qui doit être enregistré dans la base de données du logiciel d'interprétation HISTO MATCH s'il s'agit d'un nouveau lot trousse pour le laboratoire

N.B.: pour obtenir des détails, consulter le mode d'emploi du logiciel HISTO MATCH

Chaque trousse est composée de lots et de sous-lots.

- **Trousse** : par ex., **HISTO SPOT® Coeliac Disease**, définit le test
- **Lot** : par ex., **CD006, CD007**, définit la disposition et la spécificité des sondes contenues dans la trousse. Un même lot peut comporter plusieurs sous-lots.
- **Sous-lot** : par ex., **CD006-1, CD006-2, CD006-3**, définit comment une sonde réagit par rapport aux sondes de contrôle (valeurs seuil) et précise leurs dates de fabrication et de péremption.

3.2 Réactifs fournis avec la trousse HISTO SPOT® Reagent Kit

Les réactifs d'une trousse sont en quantité suffisante pour réaliser 96 tests. Chaque trousse de réactifs contient les éléments suivants.

BLOCKBUF	Tampon de blocage , prêt à l'emploi, contient 0,001 % de ProClin® 150	80 ml
HYBBUF	Tampon d'hybridation , prêt à l'emploi, contient 0,001 % de colorant, 0,1 % de dodécylsulfate de sodium, 0,001 % de ProClin® 150	40 ml
STRGWASH	Tampon de lavage drastique , prêt à l'emploi, contient 0,001 % de colorant, 0,1 % de dodécylsulfate de sodium, 0,001 % de ProClin® 150	100 ml

TBSWASH	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	100 ml
SUBS	Substrat BCIP® / NBT , prêt à l'emploi (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / chlorure de nitrobleu de tétrazolium)	36 ml
CONJ	Conjugué marqué à la streptavidine et à la phosphatase alcaline, concentré contient < 0,1 % d'azide de sodium (à diluer au 1:1666 ^e dans du tampon de blocage)	40 µl

3.3 Réactifs et équipements nécessaires mais non fournis

- Processeur MR.SPOT® avec le logiciel HISTO MATCH, **RÉF** 726100
- Pointes de pipette pour le processeur MR.SPOT®, 1 000 µL **RÉF** 726099 et 200 µL **RÉF** 726097
- Réactifs d'extraction de l'ADN (pas de méthode de relargage [salting out])
- Plaques PCR à jupe avec couvercles ou film adhésif (plaques PCR HISTO SPOT®, **RÉF** 726095, bouchons PCR HISTO SPOT®, **RÉF** 726090, feuilles PCR HISTO SPOT®, **RÉF** 726089)
- Thermocycleur
- Eau désionisée
- Pipettes à volume variable (gamme 0,5 – 1 000 µl) et pointes jetables

4. CONSERVATION ET STABILITÉ

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 réactif. Elle est valable pour les réactifs non entamés. La date de péremption indiquée sur l'étiquette externe correspond au réactif de la trousse ayant la validité la plus courte. Il est possible d'entamer des barrettes individuelles de 8 puits, de détacher les cupules nécessaires pour une série 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 doivent être utilisées dans les 30 jours suivant l'ouverture. Les autres réactifs ouverts doivent être utilisés dans les 3 mois. La dilution du conjugué doit toujours être préparée fraîchement pour chaque série de test.

5. PROTOCOLE

5.1. Précautions et recommandations

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 typages erronés, dans le cas particulier des discordances entre les méthodes de sérologie et de génétique moléculaire.

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 des zones de travail séparées pour les tâches avant l'amplification (isolement de l'ADN et préparation des réactions) et après l'amplification (hybridation et détection). De préférence, utiliser deux pièces différentes.
- ◆ Les amplicons ne doivent pas être ramenés dans la zone de préparation de la PCR.
- ◆ Utiliser les dispositifs et autres matériels uniquement à leur place respective et ne pas les échanger.

5.2 Isolement de l'ADN

Préparer l'ADN échantillon par la méthode habituelle du laboratoire d'isolement de l'ADN utilisée avec la PCR (de préférence, pas de méthode de relargage). 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. L'ADN de l'échantillon doit avoir une concentration comprise entre 15 et 30 ng/μL et un indice de pureté (rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀) compris entre 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.

5.3 Amplification de l'ADN

Utiliser des plaques 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 PCR HISTO SPOT® ont été validées pour cette application. Les plaques 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.

Pré-mélange initial pour plusieurs échantillons

Nb d'échantillons +2	x	10 μL mélange initial	} utiliser 15 μL de pré-mélange initial par échantillon
Nb d'échantillons +2	x	5 μL MgCl ₂	

Remarque : il est important que la concentration en ADN soit comprise entre **15 et 30 ng/μL**. Des concentrations plus élevées peuvent conduire à des réactions de sondes 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 amplifier sous les conditions suivantes :

Étape de programme	Durée	Température	Nb de cycles
Première dénaturation	2 min	96 °C	1 cycle
Dénaturation	15 sec	96 °C	10 cycles
Hybridation + extension	60 sec	65 °C	
Dénaturation	10 sec	96 °C	20 cycles
Hybridation	50 sec	61 °C	
Extension	30 sec	72 °C	
Attente (Hold)	∞	22 °C	

Les conditions sont identiques pour tous les thermocycleurs. Toutefois, le temps total nécessaire pour cette étape varie selon la vitesse de rampe du thermocycleur utilisé.

Les modèles suivants de thermocycleurs ont été validés avec le test HISTO SPOT SSO.

Applied Biosystems : PE 9600, PE 9700, 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.

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.

5.4 Hybridation & Détection automatisées sur MR.SPOT®

5.4.1 Préparation des réactifs nécessaires

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

On peut 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 aliquot.

Le conjugué doit être dilué au **1:1 666^e** dans du tampon de blocage. La dilution du conjugué doit toujours être préparée fraîchement pour 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. Remplir les volumes nécessaires de réactifs dans les flacons étiquetés correspondants.

Placer les cupules réactionnelles et la plaque PCR sur les portoirs respectifs du processeur Mr. SPOT®. Respecter la bonne orientation de la plaque PCR.

Les barrettes de test peuvent être scindées en puits unitaires selon la figure 1, si le nombre de tests à réaliser est inférieur à 8 :

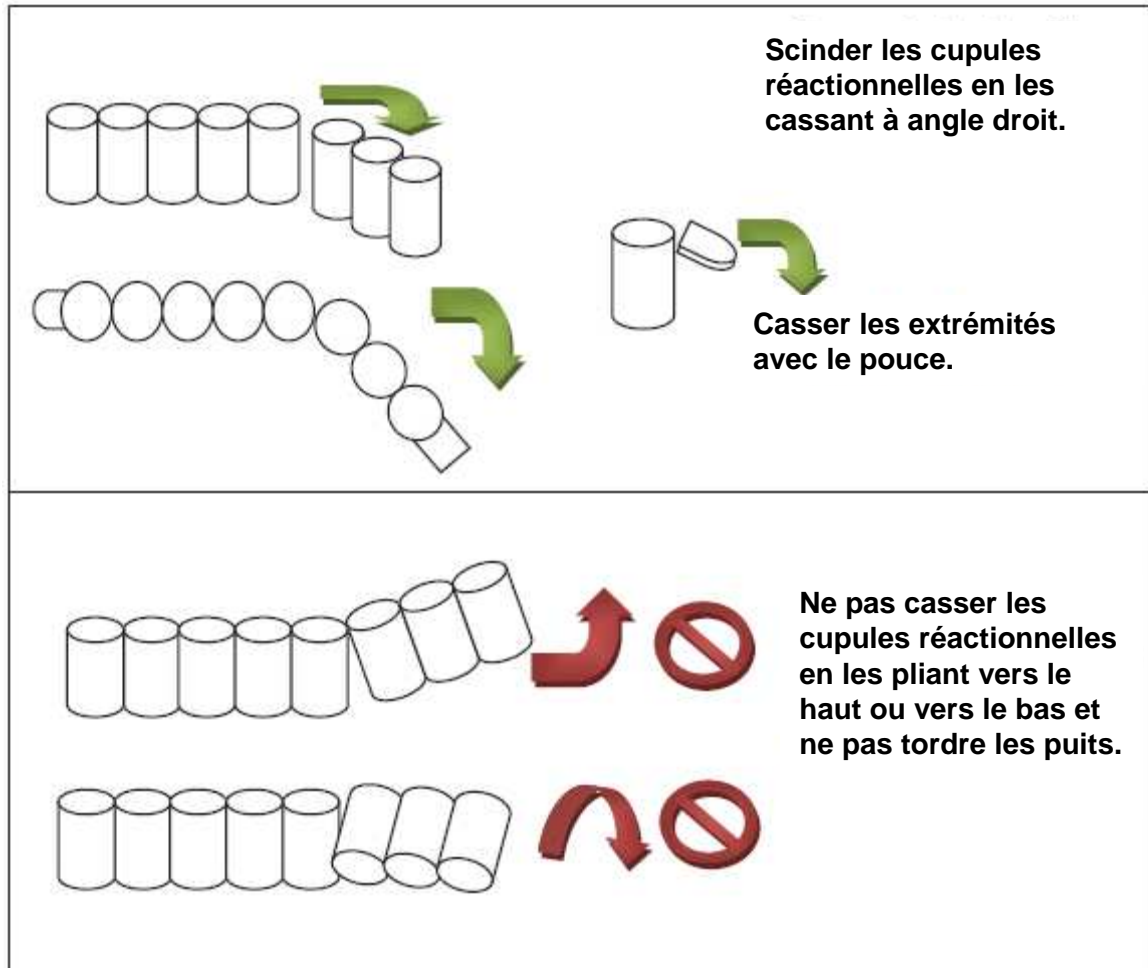


Figure 1 : séparation des cupules réactionnelles unitaires

5.4.2 Démarrage du processeur MR.SPOT®

Mettre le processeur MR.SPOT® sous tension. L'écran de démarrage s'affiche. Réaliser les opérations en suivant les indications à l'écran. Les détails sont décrits dans le manuel utilisateur du processeur MR.SPOT®.

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 à l'aide du logiciel HISTO MATCH

Ouvrir le logiciel HISTO MATCH (si celui-ci n'est pas 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.

6. PRÉCAUTIONS ET TRAITEMENT DES DECHETS

Le test HISTO SPOT® est conçu pour une utilisation de diagnostic *in vitro* et il doit être manipulé par du personnel qualifié et formé. Toute la manipulation 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 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).

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. Toutefois, éviter 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 l'accumulation 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 aliquot dans les flacons. L'utilisation de pipettes et de pointes de pipettes stériles jetables est recommandée. Ne pas utiliser de réactifs présentant une turbidité ou une contamination microbienne apparentes.

Les Fiches de Données de Sécurité (FDS) peuvent être téléchargées à l'adresse www.bag-healthcare.com.

7. CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES

7.1 Évaluation des performances

Chaque trousse HISTO SPOT® SSO a fait l'objet d'évaluation avec des échantillons d'ADN de typage connu. Les résultats ont été comparés à ceux d'autres méthodes de typage (p.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 avec l'ADN d'échantillons de référence.

7.2 Amplification par PCR

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

7.3 Résolution de la technique

La trousse HISTO SPOT® Coeliac Disease est conçue pour fournir des résultats sans ambiguïté sur les allèles HLA associés à la maladie cœliaque.

Des associations d'allèles différentes qui recoupent les groupes d'allèle mais qui présentent le même schéma de sonde positive sont considérées comme ambiguës.

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, seuls des échantillons d'ADN avec une concentration comprise entre 15 et 30 ng/µl et un indice de pureté (rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀) compris entre 1,5 et 2,0 doivent être utilisés.

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 (p.ex. : BAG Wipetest, 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 corrects.

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 des thermocycleurs peuvent être testées p.ex. avec le test BAG CylerCheck (REF 7104).

9. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Le contrôle qualité interne des nouveaux lots de la trousse HISTO SPOT® Coeliac Disease peut être réalisé avec une association d'échantillons d'ADN de type HLA connu.

Chaque cupule réactionnelle contient des contrôles positifs internes pour vérifier la réussite de l'amplification et de l'hybridation.

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

10. GESTION DES INCIDENTS








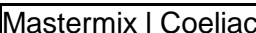
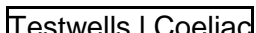







Symptôme	Problème(s) possible(s)	Solution(s) éventuelle(s)
Dysfonctionnement de l'instrument	Nombreux	Consulter le manuel utilisateur du processeur MR.SPOT®
Message d'erreur au transfert de données	Erreur de transfert des données	Transférer les données manuellement avec une clé USB
Pas de résultat	Erreur sur l'image quadrillée	Réaliser manuellement le quadrillage
Aucun spot dans le puits	Mélange initial non ajouté à la PCR	Recommencer toute l'analyse et vérifier le produit PCR sur gel
Seuls les spots de contrôle sont positifs	ADN non ajouté à la PCR ou erreur d'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 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

ProClin® est une marque commerciale de Rohm & Haas.

BCIP® est une marque commerciale de Sigma Aldrich Co.

12. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS

	Pour usage de diagnostic <i>in vitro</i>
	Température de conservation
	N° de lot
	Utiliser avant
	Code produit
	Consulter la Notice utilisateur
	Destiné au : Typage HLA
	Mélange initial pour l'amplification des loci spécifiques
	Cupules réactionnelles avec des sondes fixées pour typer les allèles spécifiques du risque de déclarer une maladie céliaque
	Solution de chlorure de magnésium
	Tampon de blocage
	Tampon d'hybridation
	Solution de lavage drastique
	Tampon TBS (Tris buffered saline)
	Substrat
	Conjugué (Streptavidine marquée à la phosphatase alcaline)

Pour les notices d'utilisation en d'autres langues, consulter :
<http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/>