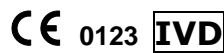


## Notice utilisateur

# Trousses HISTO TYPE SSP

Trousses de test pour le typage des allèles HLA par technique de génétique moléculaire  
(Classe I : HLA-A, B, C et Classe II : HLA-DR, DQ)



**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.**

prêts à l'emploi, pré-aliquotés

Version : 12/2014  
Edition : 2014-05

<b>RÉF</b> 70721	<b>HISTO TYPE A low</b>	<b>RÉF</b> 707211	<b>HISTO TYPE A Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 70731	<b>HISTO TYPE B low</b>	<b>RÉF</b> 707311	<b>HISTO TYPE B Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 70741	<b>HISTO TYPE C low</b>	<b>RÉF</b> 707411	<b>HISTO TYPE C Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 70751	<b>HISTO TYPE DR low</b>	<b>RÉF</b> 707511	<b>HISTO TYPE DR Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 70891	<b>HISTO TYPE DQB low</b>	<b>RÉF</b> 708911	<b>HISTO TYPE DQB Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 7098	<b>HISTO TYPE A/B/DR</b>	<b>RÉF</b> 709811	<b>HISTO TYPE A/B/DR Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 7102	<b>HISTO TYPE A/B/C</b>	<b>RÉF</b> 710211	<b>HISTO TYPE A/B/C Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 7103	<b>HISTO TYPE DR/DQB</b>	<b>RÉF</b> 710311	<b>HISTO TYPE DR/DQB Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 709010	<b>HISTO TYPE DQB high</b>	<b>RÉF</b> 709011	<b>HISTO TYPE DQB high Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 7070	<b>HISTO TYPE B27 low</b>	<b>RÉF</b> 707011	<b>HISTO TYPE B27 (48) Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 7071	<b>HISTO TYPE B27 low</b>	<b>RÉF</b> 707111	<b>HISTO TYPE B27 (96) Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 70941	<b>HISTO TYPE Celiac Disease</b>	<b>RÉF</b> 709411	<b>HISTO TYPE Celiac Disease Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 70715	<b>HISTO TYPE B57</b>	<b>RÉF</b> 707151	<b>HISTO TYPE B57 Happy Pack</b>
<b>RÉF</b> 70716	<b>HISTO TYPE Narcolepsy</b>	<b>RÉF</b> 707161	<b>HISTO TYPE Narcolepsy Happy Pack</b>

Les références HISTO TYPE Happy Pack renferment systématiquement une trousse de typage **HISTO TYPE** plus une trousse de polymérase validée **Happy Taq**.

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](mailto:info@mediane-diag.fr)**

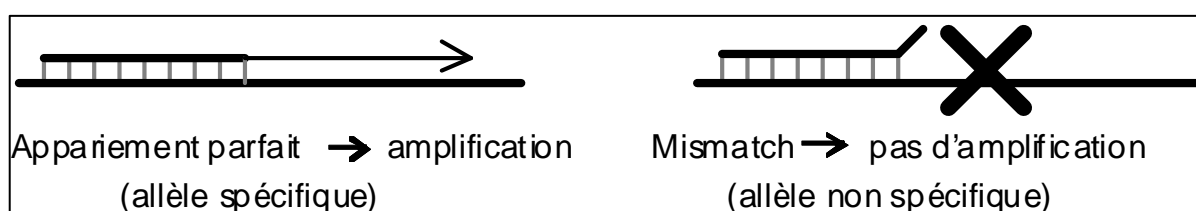
## Table des matières

1. DESCRIPTION DES PRODUITS.....	3
1.1. Contexte résumé du test HISTO TYPE Celiac Disease .....	3
1.2. Contexte résumé du test HISTO TYPE B57 .....	3
1.3. Contexte résumé du test HISTO TYPE Narcolepsy .....	3
1.4. Contexte résumé du test HISTO TYPE B27.....	4
2. MATÉRIEL .....	4
2.1. Contenu des troussees HISTO TYPE SSP .....	4
2.2. Contenu des ensembles HISTO TYPE Happy Pack .....	4
2.3. Matériel supplémentaire nécessaire .....	5
2.4. Conservation et stabilité .....	6
3. CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES .....	6
4. PROTOCOLE.....	7
4.1. Conditions de sécurité et remarques spécifiques .....	7
4.2. Isolement de l'ADN.....	7
4.3. Amplification .....	7
4.4. Électrophorèse sur gel.....	10
4.5. Documentation et interprétation .....	11
5. PRÉCAUTIONS ET TRAITEMENT DES DÉCHETS .....	11
6. GESTION DES INCIDENTS .....	13
7. BIBLIOGRAPHIE .....	15
8. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS .....	16

## 1. DESCRIPTION DES PRODUITS

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est désormais utilisée en routine pour le typage HLA. La connaissance des séquences des allèles HLA [1] facilite le typage sans ambiguïté au niveau de l'ADN avec une haute résolution, et présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes sérologiques traditionnellement utilisées.

L'ADN purifié constitue le matériau de base du typage avec les trousse/ ensembles **HISTO TYPE SSP**. Le test est réalisé par PCR-SSP (PCR par amorces spécifiques de séquence ou *Sequence Specific Primers*, voir figure 1) [2, 3]. Cette méthode est basée sur le fait que l'extension de l'amorce, et donc la réussite de la PCR repose sur l'appariement exact de l'extrémité 3' des deux amorces. Donc, l'amplification n'est obtenue que si les amorces correspondent en totalité à la séquence cible. Elle est ensuite visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.



**Figure 1** Principe de la PCR-SSP

La composition des mélanges individuels d'amorces permet une identification claire des types HLA indiqués sur les diagrammes d'évaluation respectifs. Chaque typage utilise un certain nombre de mélanges réactionnels **pré-aliquotés** et **séchés** d'un volume final de 10 µL et comprenant un contrôle interne d'amplification.

### 1.1. Contexte résumé du test HISTO TYPE Celiac Disease

La maladie cœliaque est une réaction auto-immune dirigée contre le gluten, un ingrédient présent dans plusieurs céréales. Si elle n'est pas diagnostiquée assez tôt, la maladie provoque une inflammation chronique et une destruction de l'intestin grêle. La maladie cœliaque est fortement associée aux haplotypes DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 et DQA1\*03-DQB1\*03:02. En outre, les allèles DR3, DR7 et DR11 peuvent être utilisés comme marqueurs génétiques [8-10].

### 1.2. Contexte résumé du test HISTO TYPE B57

Les médicaments antirétroviraux (p.ex. pour le traitement du VIH) contenant de l'abacavir comme substance active sont autorisés uniquement chez les patients ne présentant pas l'allèle HLA B\*57:01. En effet, la présence de cet allèle est associée à une réaction potentielle d'hypersensibilité [11-13].

### 1.3. Contexte résumé du test HISTO TYPE Narcolepsy

La narcolepsie est un trouble du sommeil avec des symptômes tels qu'une somnolence diurne excessive, une paralysie du sommeil ou des hallucinations. 98 % des patients caucasiens atteints de narcolepsie présentent l'haplotype DRB1\*15:01 – DQA1\*01:02 – DQB1\*06:02. Par conséquent, le typage HLA est utile pour confirmer ou exclure le diagnostic [14-16].

#### 1.4. Contexte résumé du test HISTO TYPE B27

L'association du HLA-B27 avec les symptômes des polyarthrites séronégatives (maladie de Bechterew, maladie de Reiter, arthrite réactionnelle) est couramment utilisée pour diagnostiquer ces maladies. Un résultat HLA-B27 positif est associé à un risque très élevé de maladie (voir Tableau 1) [17-18]. Et surtout, un résultat de diagnostic HLA-B27 confirmé apporte une contribution importante à la thérapie du patient dans les cas incertains de maladie de Bechterew suspectée.

Maladie	Fréquence du B27 chez les patients	Risque relatif
Spondylite ankylosante (maladie de Bechterew)	90,2 %	91
Maladie de Reiter	78,8 %	37,6
Arthrite réactive postérieure à une infection	70,2 %	

**Tableau 1** Fréquence de l'allèle HLA-B27 et risques

## 2. MATÉRIEL

### 2.1. Contenu des trousse HISTO TYPE SSP

- ◆ **Plaques/ barrettes HISTO TYPE** pour le typage HLA. Les mélanges réactionnels pré-aliquotés et séchés sont composés des amorces spécifiques de l'allèle, des amorces du contrôle interne (spécifique du gène humain G3PDH) et de nucléotides. Le premier mélange réactionnel (n°1) est marqué (consulter page 8 pour le schéma des mélanges). Dans certaines trousse HISTO TYPE, le contrôle de contamination se situe sur le dernier emplacement de la plaque (consulter la table de spécificité et la table d'interprétation spécifiques du lot). Le numéro du lot est imprimé sur chaque plaque/barrette.
- ◆ **Barrettes PCR (à 8x) de contrôles** de contamination contenant les amorces du contrôle interne et les amorces spécifiques de l'amplicon (ne sont pas fournies si le contrôle de contamination est intégré au dernier puits de la plaque/ barrette du test et dans le cas du test HISTO TYPE B27).
- ◆ **Tampon PCR 10x.**
- ◆ **Bouchons** de barrette ou opercules PCR.
- ◆ **Notice utilisateur**
- ◆ **Table de spécificité**, diagramme d'évaluation et fiche de travail (ne sont pas fournies pour le test HISTO TYPE B27).

### 2.2. Contenu des ensembles HISTO TYPE Happy Pack

- ◆ Trousse HISTO TYPE (pour le contenu voir paragraphe 2.1).
- ◆ Happy Taq (REF 70977) prête à l'emploi, 50 µl (250 U)/flacon, 5 unités/µl, enzyme recombinante, activité exonucléase 5' → 3'

HISTO TYPE A Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70721, 1 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE B Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70731, 2 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE C Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70741, 1 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE DR Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70751, 1 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE DQB Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70891, 1 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE ABDR Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 7098, 4 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE ABC Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 7102, 4 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE DR/DQB Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 7103, 2 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE DQB high Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 709010, 2 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE B27 (48) Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 7070, 1 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE B27 (96) Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 7071, 1 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE Celiac Disease Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70941, 1 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE B57 Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70715, 1 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977
HISTO TYPE Narcolepsy Happy Pack:	1 x <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70716, 1 x Happy Taq <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">RÉF</span> 70977

### 2.3. Matériel supplémentaire nécessaire

- ◆ Trousse Happy Taq (RÉF 70977) ou une autre Taq polymérase validée par l'utilisateur avec les trousse HISTO TYPE (nécessaire uniquement pour les trousse HISTO TYPE car les ensembles HISTO TYPE Happy Pack sont expédiées avec la quantité requise de Happy Taq, voir paragraphe 2.2)

**N.B. : n'utiliser en aucun cas une Taq Polymérase de qualité « hot-start » !**

- ◆ Trousse BAG EXTRA-GENE I (RÉF 7059, facultatif), pour l'extraction de l'ADN à partir de sang, lymphocytes, leucocytes, ou autre matériel, ou autres méthodes d'extraction d'ADN validées
- ◆ Pipettes à piston (0,5-250 µL)
- ◆ Embouts stériles avec filtre intégré
- ◆ Thermocycleur (veuillez consulter la liste des cycleurs validés par nos soins **page 9 !**)

### Dispositifs et matériel pour l'électrophorèse sur gel

- ◆ Agarose, qualité biologie moléculaire
- ◆ Tampon TBE 0,5x (Tris 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 0,5 mM)
- ◆ Bromure d'éthidium (EtBr)
- ◆ Appareil d'électrophorèse à gel immergé (au moins 25 puits)
- ◆ Générateur électrique (200-300 V, 200 mA)
- ◆ Échelle de P.M. (p.ex. RÉF 7097)

### Dispositifs pour l'interprétation et la documentation

- ◆ Table UV transilluminante (220-310 nm)
- ◆ Système d'acquisition d'image (p.ex. appareil photo *Polaroid* avec films 667) ou un système vidéo avec imprimante (p.ex. le modèle *KP65HM-CE*)

- ◆ Si possible un logiciel d'aide à l'interprétation, installé sur son PC (p.ex. l'application **HISTO MATCH** de *BAG Healthcare* ou le logiciel *SCORE* largement distribué à travers le monde)

## 2.4. Conservation et stabilité

Les trousse HISTO TYPE sont livrées à température ambiante. Après réception conserver tous les réactifs à une température  $\leq -20\text{ °C}$  ou entre  $2\text{ °C}$  et  $8\text{ °C}$  à l'obscurité dans des dispositifs avec surveillance de la température. **Veillez éviter les modifications fréquentes de la température de stockage.**

Pour les ensembles HISTO TYPE Happy Pack, les trousse HISTO TYPE sont livrées à température ambiante et la trousse Happy Taq sur carboglace. Conserver tous les réactifs HISTO TYPE à une température  $\leq -20\text{ °C}$  ou entre  $2\text{ °C}$  et  $8\text{ °C}$  à l'obscurité et la Happy Taq à une température  $< -20\text{ °C}$  dans des dispositifs avec surveillance de la température. **Veillez éviter les modifications fréquentes de la température de stockage.**

La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de chaque réactif. Elle reste également valable une fois les réactifs ouverts. La date de péremption indiquée sur l'étiquette externe (*trousse*) correspond au réactif ayant la validité la plus courte dans la trousse.

## 3. CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES

La composition de tous les mélanges d'amorces a été faite pour garantir une identification fiable des génotypes HLA (ce choix repose sur les données de séquence le plus récents) listés sur les fiches d'interprétation fournis. Les mises à jour sont effectuées de façon régulière.

L'exactitude et la reproductibilité concernant la spécificité de chaque mélange d'amorces ont été vérifiées pour chaque lot mis sur le marché sur un panel d'ADN connus (échantillons de référence) dont le typage HLA est parfaitement connu. Les allèles qui n'ont pas été listés car ils n'ont pas été testés du fait de leur rareté, sont identifiés sur la fiche d'interprétation et la fiche des spécificités.

Une étude de performance a été réalisée sur toutes les trousse HISTO TYPE SSP mettant en œuvre au minimum 30 échantillons d'ADN. Un autre aspect de cette étude concerne la comparaison des résultats de typage aux typages réalisés avec des trousse SSP d'autres fabricants ; aucune discordance n'a été constatée lors de ces comparaisons.

Les études de performance et tout contrôle de qualité des amorces contenus dans nos kits ont été effectués avec des ADN qui ont été isolés soit à l'aide du kit EXTRA GENE I ou encore par une technique de marque *Quiagen*. Les trousse HISTO TYPE sont validées avec la Happy Taq (RÉF 70976) ou avec la Taq polymérase de la trousse Happy Taq (RÉF 70977). En cas d'utilisation d'une autre Taq polymérase, l'enzyme en question doit être validée par l'utilisateur avec les trousse HISTO TYPE.

Un typage fiable est garanti à condition d'utiliser une quantité d'ADN qui est comprise entre **25** et **50** ng par mélange réactionnel.

## **4. PROTOCOLE**

### **4.1. Conditions de sécurité et remarques spécifiques**

La PCR est une méthode particulièrement sensible qui doit être réalisée par du personnel bien formé, ayant l'expérience des techniques de génétique moléculaire et des tests d'histocompatibilité. Les directives concernant la transplantation ainsi que les normes EFI / DGI en vigueur doivent être respectées, de manière à réduire le risque de typages erronés, et tout particulièrement dans le cas où des résultats discordants entre la sérologie et la méthode de génétique moléculaire sont observés.

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

- ◆ Porter des gants pour manipuler (sans poudre si possible).
- ◆ Utiliser de nouveaux embouts pour chaque étape de pipetage (avec un filtre intégré).
- ◆ Utiliser des zones de travail séparées pour les tâches avant l'amplification (isolement de l'ADN et préparation des réactions) et après l'amplification (électrophorèse sur gel, documentation). De préférence, utiliser deux pièces différentes.
- ◆ Utiliser les dispositifs et autres matériels uniquement à leur place respective et ne pas les échanger.

### **4.2. Isolement de l'ADN**

La trousse BAG EXTRA-GENE I (REF 7059) est particulièrement adaptée pour l'isolement puisqu'un ADN pur peut être obtenu rapidement à partir du sang total, sans utiliser de produits chimiques ni de solvants toxiques. D'autres méthodes commerciales (basées sur des techniques mettant en œuvre des colonnes ou des billes magnétiques) ou des techniques décrites dans la littérature permettent d'obtenir des ADN de pureté satisfaisante. La présence d'héparine peut inhiber la PCR [6]. De ce fait, il est recommandé d'utiliser du sang recueilli sur EDTA ou sur citrate pour le typage.

Les indices de pureté de l'ADN devraient se situer :

- ◆ Rapport  $D.O._{260}/D.O._{280} = > 1,5$  et  $< 2,0$  (indice pour une contamination par de l'ARN/ des protéines)
- ◆ Rapport  $D.O._{260}/D.O._{230} = > 1,8$  (indice pour une contamination par des sels, des glucides ou des solvants organiques)

### **4.3. Amplification**

Tous les mélanges réactionnels pré-aliquotés et séchés contiennent déjà les amorces spécifiques d'allèle et de contrôle, ainsi que les nucléotides. Ceux-ci sont livrés séchés dans la cupule réactionnelle. Les paramètres de l'amplification sont optimisés pour travailler avec un volume final de 10 µL.

1. Sortir le nombre nécessaire de plaques/barrettes HISTO TYPE HLA-SSP et le tampon PCR 10x de la trousse.
2. Préparer le mélange initial composé de tampon PCR 10x, de solution d'ADN, de Taq-polymérase et d'eau distillée et bien homogénéiser (vortex). Les différentes trousse HISTO TYPE utilisent toutes le même mélange initial et peuvent de ce fait être combinées. La composition du mélange initial en fonction du nombre de mélanges réactionnels est indiquée ci-dessous dans le tableau 2 (page 8)

Pour la trousse **HISTO TYPE B27**, il est recommandé de préparer un pré-mélange **Taq-polymérase - Tampon PCR - H<sub>2</sub>O**

<b>0,08 µL</b>	Taq polymérase (5 U/µL)	<i>x nb déterminations +1</i>
<b>1,0 µL</b>	Tampon PCR 10x	<i>x nb déterminations +1</i>
<b>7,0 µL</b>	H <sub>2</sub> O	<i>x nb déterminations +1</i>

Mélanger vigoureusement la solution et en ajouter **8,0 µL** à chaque cupule réactionnelle. Ajouter ensuite **2,0 µL de solution d'ADN** (12,5 – 25 ng/µL) à chaque pré-mélange.

Dans le cas d'une réalisation d'un **contrôle de contamination**, réaliser tout d'abord le mélange initial sans la solution d'ADN et distribuer 10 µL de ce mélange dans la cupule du contrôle (contenant du colorant bleu). Ensuite, ajouter la solution d'ADN et distribuer le mélange initial dans les cupules réactionnelles pré-aliquotées.

**Tableau 2** Composition du mélange initial en fonction du nombre de tests :

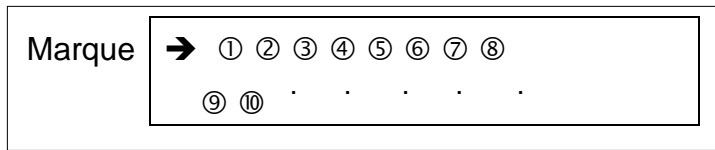
Nb de cupules	Eau distillée	Tampon PCR 10x	Solution ADN (25 - 50 ng/µL)	Happy Taq (5 U/µL)	Volume total
1	8	1	1	0,08	10 µL
4	63	8	8	0,6	80 µL
8	79	10	10	0,8	100 µL
24	222	28	28	2,2	280 µL
30	269	34	34	2,7	340 µL
32	285	36	36	2,9	360 µL
48	412	52	52	4,2	520 µL
54	459	58	58	4,6	580 µL
56	475	60	60	4,8	600 µL
72	618	78	78	6,2	780 µL
80	681	86	86	6,9	860 µL
96	808	102	102	8,2	1020 µL

⇒ **Chaque mélange réactionnel** doit contenir **25 à 50 ng d'ADN**. Si la concentration en ADN est à l'extérieur de cette fourchette il convient de corriger les différents volumes (p.ex. **pour 24 mélanges : 14 µL** de solution d'ADN (**100 ng/µL**) et **236 µL** d'eau distillée).

⇒ En cas d'utilisation d'une **autre Taq polymérase**, l'enzyme en question **doit être validée** par l'utilisateur avec les trousse HISTO TYPE.



3. Homogénéiser au Vortex et distribuer immédiatement **10 µL** de ce mélange dans les cupules réactionnelles pré-aliquotées et séchées.



Changer d'embout après chaque étape de distribution. **Bien fermer** les tubes avec les bouchons respectifs. S'assurer de ne pas toucher la paroi interne des bouchons ni les bords supérieurs des tubes avec les doigts pour éviter les contaminations. En cas d'utilisation de thermocycleurs équipés de capot fermé par serrage, il est également possible d'utiliser des tapis PCR en silicone réutilisables.

Agiter légèrement la plaque/barrette vers le bas pour dissoudre le résidu situé au fond de la cupule, tout le mélange PCR doit ainsi être déposée au fond de la cupule (le cas échéant faire accélérer la plaque/barrette à l'aide d'une centrifugeuse).

4. Placer les tubes réactionnels dans le thermocycleur (veiller à ce que les cupules soient bien callées sur le bloc chauffant) et lancer le programme PCR.

**N.B. :** il n'est **pas** nécessaire de recouvrir les mélanges réactionnels avec de l'huile minérale en présence d'un couvercle chauffant et ajusté

### Paramètres d'amplification

Étape de programme	T°	Durée	Nb de cycles
Première dénaturation	96 °C	5 mn	1 cycle
Dénaturation	96 °C	20 s	5 cycles
Hybridation + extension	68 °C	1 mn	
Dénaturation	96 °C	20 s	10 cycles
Hybridation	64 °C	50 s	
Extension	72 °C	45 s	
Dénaturation	96 °C	20 s	15 cycles
Hybridation	61 °C	50 s	
Extension	72 °C	45 s	
Extension finale	72 °C	5 mn	1 cycle

### Thermocycleurs validés :

- ◆ PTC 100 / 200 / C1000 (MJ Research/ BioRad)
- ◆ GeneAmp PCR-System 9600 & 9700 (**N.B.:** veuillez utiliser la vitesse de montée en température du modèle « classique » = **9600**) (ABI, Life Technologies)

- ◆ Mastercycler epGradient S (**N.B.:** veuillez utiliser la fonction « simulate Mastercycler gradient ») (Eppendorf)
- ◆ Tprofessional (Biometra)

**ATTENTION :** ne pas utiliser de bloc chauffant en aluminium (p.ex. GeneAmp PCR-System 9600 / 9700)

**N.B. :** lors de l'usage de thermocycleurs à vitesse très rapide de montée et descente en température, il est recommandé de réduire ces vitesses (~ 2,5 °C/seconde)

**Rappel :** il peut être nécessaire d'optimiser ces paramètres d'amplification du fait que les thermocycleurs de différents fabricants fonctionnent souvent différemment, voire un instrument du même type peut aussi montrer des performances différentes. Nous rappelons qu'il est nécessaire de vérifier, et le cas échéant, paramétrer tout autre appareil (optimisation des paramètres d'amplification si nécessaire) et que la validation du matériel par l'utilisateur est nécessaire avant toute utilisation.

Pour optimiser le protocole sur votre appareil, vous pouvez procéder comme suit :

- en cas de résultats **faussement positifs** (bandes non spécifiques, supplémentaires), augmenter la température d'hybridation par pas de 1 °C.
- en cas de résultats **faussement négatifs** (bandes et/ou contrôles manquants) réduire la température d'hybridation par pas de 1 °C et/ ou augmenter les durées d'hybridation par pas de 5 secondes et/ ou augmenter les durées de dénaturation par pas de 5 secondes.

**Il est recommandé d'utiliser des thermocycleurs régulièrement calibrés.**

Pour contrôler la calibration de votre thermocycleur notre produit CYCLER-CHECK (RÉF 7104) est particulièrement adapté.

**N.B. :** nous réalisons nos contrôles de qualité en utilisant des thermocycleurs des marques PTC-200, C-1000 (*MJ Research*), 9700 (*ABI*), Mastercycler epGradient S (*Eppendorf*) et Tprofessional (*Biometra*)

#### 4.4. Électrophorèse sur gel

La séparation des produits d'amplification est réalisée par électrophorèse sur un gel (horizontal) d'agarose. Le tampon d'électrophorèse recommandé est le TBE 0,5x (Tris 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 0,5 mM). Le gel doit contenir une concentration de 2,0-2,5 % d'agarose. Laisser le gel polymériser pendant au moins 30 minutes avant de déposer les échantillons. Une fois l'amplification terminée, sortir les échantillons du thermocycleur et déposer soigneusement la totalité des mélanges réactionnels sur chaque position du gel. Ajouter dans la piste supplémentaire 10 µL de l'échelle ADN pour la comparaison des tailles. Réaliser la séparation par électrophorèse à 10-12 V/cm (avec une distance de 20 cm entre les électrodes, donc environ 200-240 V) pendant 20-40 minutes. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel complet est coloré dans une solution de bromure d'éthidium (EtBr, environ 0,5 µg/mL d'EtBr dans de l'eau ou du tampon

TBE) pendant 30-40 minutes. Il est également possible d'ajouter l'EtBr (0,5 µg/mL) au tampon d'électrophorèse ou au gel d'agarose. Au besoin, l'excès d'EtBr peut être éliminé en immergeant le gel dans de l'eau pendant 20-30 minutes.

#### 4.5. Documentation et interprétation

Pour la documentation, visualiser l'amplification PCR à l'aide d'un transilluminateur UV (220-310 nm) et photographier avec un appareil photo, une pellicule et des filtres adaptés (p.ex. Polaroid, pellicule de type 667). Choisir le temps d'exposition et l'ouverture pour que les bandes soient bien nettes et se détachent du fond sombre (données approximatives : ouverture 11, temps d'exposition 1 seconde).

Pour l'interprétation, utiliser le tableau de spécificité et le diagramme d'évaluation (voir feuilles supplémentaires jointes à cette Notice utilisateur). Seules les bandes ayant la taille correcte par rapport à l'échelle ADN doivent être considérées positives.

Dans la trousse **HISTO TYPE B27**, les **bandes spécifiques** ont une longueur de **420 pb** et/ou **85 pb**.

Pour les autres produits HISTO TYPE, **les tailles correctes** sont indiquées dans le tableau et le diagramme. Dans toutes les pistes sans amplification spécifique d'allèle, le **contrôle interne** de **1 070 pb** doit être clairement visible (excepté pour la trousse **HISTO TYPE Celiac Disease 1 070 pb/429 pb**). Dans la plupart des pistes avec une amplification spécifique (ou non spécifique) d'allèle, le contrôle interne est plus faible ou disparaît complètement. En cas de résultats inexploitable, consulter le guide de dépannage (paragraphe 6.).

Aucune bande ne doit être visible sur le **contrôle de contamination**. En cas de contamination avec de l'ADN génomique, une bande est visible à 282 pb. Des bandes supplémentaires peuvent être présentes à 78 pb, 104 pb, 176 pb et autour de 580 pb. En cas de contamination avec les amplicons, des bandes sont visibles à 78 pb et/ou 104 pb et/ou 176 pb et/ou 282 pb et/ou 580 pb.

Pour l'interprétation des résultats il est fortement recommandé d'utiliser l'application **HISTO MATCH** (gratuite auprès de *BAG Healthcare*) ou le logiciel SCORE (version complète). Les fichiers utilisés pour l'évaluation peuvent être obtenus sur le serveur de téléchargement (<http://service.bag-healthcare.com>) ou auprès de notre service clients (téléphone : +49 (0)6404-925-125).

## 5. PRÉCAUTIONS ET TRAITEMENT DES DÉCHETS

Le bromure d'éthidium est un agent mutagène puissant. Porter des gants pour manipuler les gels ou les solutions contenant de l'EtBr. Noter les instructions d'utilisation et les avertissements et précautions du fabricant. Le transilluminateur émet une lumière UV à longueur d'onde très courte qui peut provoquer des brûlures de la peau et de la rétine. Utiliser un masque facial anti-UV.

**Tous les produits biologiques utilisés pour l'extraction d'ADN** (p.ex. 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).

## 6. GESTION DES INCIDENTS

Problème	Raison possible	Solution
Pas d'amplification, échelle ADN visible	ADN contaminé par des inhibiteurs de PCR <u>ou</u> dégradé	Isoler l'ADN, le cas échéant, avec une autre méthode
	Concentration en ADN trop élevée ou trop faible	Modifier la concentration en ADN ; ré-isoler l'ADN
	Enzyme absente ou en concentration trop faible	Faire le typage, modifier la concentration de l'enzyme
	ADN provenant de sang hépariné	Refaire le typage avec du sang recueilli sur EDTA
	Paramètres d'amplification incorrects	Optimiser les paramètres d'amplification (voir §4.3) ☆
Échec répété sur certaines pistes (absence de bandes de contrôle)	Scellage pas étanche et donc fuite dans les cupules PCR; perte d'eau et modification des conc. au cours de la PCR	Bien sceller les cupules PCR ; utiliser d'autres cupules PCR
Amplification non spécifique, bandes supplémentaires (les bandes supplémentaires d'une taille non significative doivent être négligées)	Contamination par les produits d'amplification	Refaire le typage en suivant le protocole exact
	ADN contaminé par des sels	Isoler l'ADN, le cas échéant, avec une autre méthode
	Concentration en ADN trop élevée	Utiliser moins d'ADN
	Concentration en enzyme trop élevée	Utiliser moins d'enzyme
	Paramètres d'amplification incorrects	Optimiser les paramètres d'amplification (voir §4.3) ☆





Le résultat donne plus de 2 spécificités	Contamination par un autre ADN ; nouvel allèle	Vérifier les mélanges de typage (sans ajout d'ADN ajouté) ; appliquer le protocole exact
Pas de bandes visibles ou bandes très faibles, échelle ADN quasi invisible	Coloration à l'EtBr trop faible	Refaire la coloration
Le fond du gel est trop clair	Durée de coloration trop longue, concentration en EtBr trop élevée	Tremper le gel dans de l'eau ; réduire la concentration en EtBr
Bande floue	Tampon d'électrophorèse trop chaud, ou « épuisé », mauvaise composition du tampon d'électrophorèse ou encore polymérisation insuffisant du gel	Réduire la tension, utiliser du tampon TBE 0,5x (frais)

☆ Si l'équipement et les matériels utilisés sont ceux proposés dans cette notice, l'optimisation des paramètres d'amplification ne doit être envisagée qu'en dernier ressort. Dans la plupart des cas, il est possible d'évaluer le test sans tenir compte des bandes supplémentaires de taille discordante.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

1. Bodmer, J., 1993. Immunogenetics **37**:79-94
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367
8. Sacchetti et al., 1997. Clin Chem **43**:2204-2206
9. Edwin Liu et al., 2005. Gastroenterology **128**:33.37
10. Husby et al., 2012. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition **54**:136-160
11. Deutsches Ärzteblatt vom 10.03.2008
12. Mallal et al., Lancet 2002; 359: 727-732
13. Mallal et al., New England Journal of Medicine 2008; 358: 568-579
14. Nishino, S. et al., 2000. Sleep Medicine Reviews **4**:75-99
15. Mignot, E. et al., 2001. Am. J. Hum. Genet. **68**:686-699
16. Overeem, S. et al. 2008. Sleep Medicine Reviews **12**:95-107
17. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet **i**:904-907
18. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706

## 8. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS

	Température de conservation
	Utiliser avant
	Consulter la Notice utilisateur
	Suffisant pour « n » tests
CONT	Contenu, contient
CONTROL   CC	Contrôle de contamination
HLA TYPING	Destiné au : Typage HLA
IFU	Notice d'utilisation
IVD	Pour usage de diagnostic <i>in vitro</i>
LOT	N° de Lot
OR	Ou
PCRBUF   10x	Tampon PCR, concentré 10 x
PCRCAP	Couvercles pour barrettes PCR
PCRFOIL	Films de scellage pour barrettes PCR
PCRPLATE	Plaques PCR
PCRSTRIP	Barrettes PCR
REACTIONMIX	Mix initial
REF	Code produit
RTU	Prêt à l'emploi
TAQ POLYMERASE	Taq polymérase
WORKSHEET	Feuille d'interprétation

**N.B.** : pour les *modes d'emploi* en d'autres langues, veuillez utiliser ce lien :

<http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/>