

**FR**

## Notice utilisateur

# FastQ B\*27

Trousse de test pour la détermination de l'allèle HLA-B\*27  
par méthode de génétique moléculaire

Version électronique de la notice utilisateur : [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)

**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**

**IVD****RÉF 728208 FastQ B\*27****CE**

### Table des matières

1. UTILISATION PRÉVUE .....	2
2. DESCRIPTION DU PRODUIT .....	2
3. PRINCIPE DU TEST .....	2
4. MATÉRIEL .....	2
4.1 Contenu de la trousse FastQ B*27 .....	2
4.2 Réactifs et dispositifs supplémentaires requis .....	3
4.3 Thermocycleurs et tubes réactionnels validés .....	3
4.4 Recommandations pour les thermocycleurs et les tubes réactionnels non validés .....	3
5. CONSERVATION ET STABILITÉ .....	4
6. PROTOCOLE .....	4
6.1 Précautions de sécurité et recommandations particulières .....	4
6.2 Isolement de l'ADN .....	4
6.3 Amplification .....	5
6.4 Interprétation des résultats .....	6
7. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS .....	7
8. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DES PERFORMANCES .....	8
9. LIMITES DE LA MÉTHODE .....	8
10. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE .....	8
11. GESTION DES INCIDENTS .....	9
12. MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT .....	9
13. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS SUR LES EMBALLAGES .....	10
14. BIBLIOGRAPHIE .....	10

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)**

**Version : 4/2020 / Édition : avril 2020**

## 1. UTILISATION PRÉVUE

La gamme de produits FastQ est conçue pour l'analyse génétique de marqueurs humains associés à des maladies ou des réactions pharmacogénétiques. La trousse FastQ B\*27 détecte la présence des allèles HLA-B\*27 associés à certaines maladies auto-immunes (voir Description du produit).

## 2. DESCRIPTION DU PRODUIT

La trousse **FastQ B\*27** 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-B\*27 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 **FastQ B\*27** couvre tous les sous-types fréquents de l'allèle HLA-B\*27. Elle fait par ailleurs la distinction entre les allèles associés à la maladie et les sous-types HLA-B\*27:06 et HLA-B\*27:09, qui ne sont pas associés à la spondylarthrite ankylosante (3).

## 3. 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 est mené sur 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.

## 4. MATÉRIEL

### 4.1 Contenu de la trousse FastQ B\*27

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

#### 4.2 Réactifs et dispositifs supplémentaires requis

- Réactifs pour l'isolement de l'ADN (voir les trousse d'isolement de l'ADN validées au chapitre 6.2)
- Thermocycleur PCR en temps réel (voir les thermocycleurs validés au chapitre 4.3)
- Tubes réactionnels pour RT-PCR avec capuchons ou films (voir les produits validés au chapitre 4.3)
- Eau distillée
- Pipettes à piston (0,5 à 1 000 µl) et embouts
- Trousse pour *Colour Compensation* du LightCycler® 480 II (fourni sur demande, sans surcoût, par la société BAG Diagnostics)

#### 4.3 Thermocycleurs et tubes réactionnels validés

Thermocycleur	Tubes réactionnels pour RT-PCR	Systèmes de fermeture pour RT-PCR
Système de détection de PCR en temps réel CFX96™ Bio-Rad	Plaque PCR sécable FrameStar® Break-A-Way, 96 puits blancs, cadre noir Réf. 4ti-1201 Fabricant 4titude / Brooks Life Sciences	Barrettes 4titude Crystal Réf. 4ti-0755 Film adhésif optique transparent Réf. 4ti-0560 4titude/Brooks Life Sciences

#### 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.

#### 4.4 Recommandations pour les thermocycleurs et les tubes réactionnels non validés

Les thermocycleurs mentionnés ci-dessous doivent faire l'objet de tests initiaux mais pas d'une validation complète. Le tableau présente les spécifications recommandées.

Thermocycleur	Tubes réactionnels pour RT-PCR	Systèmes de fermeture pour RT-PCR
LightCycler® 480 Roche	Plaque 96 cupules pour LightCycler® 480, blanche, réf. 4729692001 Roche	Film étanche pour LightCycler® 480, réf. 4729757001 Roche
MIC (thermocycleur à induction magnétique) Bio Molecular Systems	Tubes et capuchons : MIC-TUBES, réf. 68MIC-60653 Distributeur exclusif (D/A) : Biozyme	
Rotor-Gene Q Qiagen	Barrettes de tubes et de capuchons, 0,1 ml, réf. 981103 ou 981106 Qiagen	
Lightcycler 2.0 Roche	cf. ci-dessus	

## 5. CONSERVATION ET STABILITÉ

Les trousse sont expédiées réfrigérés (2 - 8 °C). Dès réception, conserver tous les réactifs dans des dispositifs contrôlés en température à  $\leq -20$  °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 le nombre maximal de cycles n'affectant pas la qualité de la trousse est de 6 pour le composant *Q Plex Mix* et de 15 pour le composant *Q Primermix B27*. Aucune donnée sur un nombre plus élevé de cycles n'est disponible à ce jour. Il est donc recommandé d'aliqoter les réactifs si nécessaire.

## 6. PROTOCOLE

### 6.1 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 et expérimenté. 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.

### 6.2 Isolement de l'ADN

L'échantillon de sang pour isoler l'ADN génomique doit être recueilli dans des dispositifs adaptés. 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.

#### Trousse d'isolement de l'ADN validées

- Trousse Qiagen QIAamp DNA Blood Kit (colonne)
- Trousse Chemagic™ 360 (billes)

Si la méthode habituellement utilisée au laboratoire pour isoler l'ADN génomique ne figure pas dans la liste des trousse validées ci-dessus, celle-ci doit être validée par l'utilisateur.

Une concentration en ADN comprise entre 10 et 20 ng/ $\mu$ l est requise pour réaliser le test FastQ B\*27.

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

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

### 6.3 Amplification

Utiliser les tubes réactionnels recommandés par le fabricant du thermocycleur en temps réel ou les matériels recommandés dans le chapitre 4.3.

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

- 2  $\mu\text{l}$  mélange d'amorces Q
- 2  $\mu\text{l}$  mélange Plex
- 1  $\mu\text{l}$  échantillon d'ADN (10 à 20 ng/ $\mu\text{l}$ )
- 5  $\mu\text{l}$  eau distillée

Le volume de réaction pour chaque test RT-PCR est de 10  $\mu\text{l}$ .

#### Exceptions recommandées

##### Rotor-Gene Q

**Avec le thermocycleur Rotor-Gene Q, le volume de réaction doit être plus élevé. Celui-ci doit être défini à 20  $\mu\text{l}$  dans les paramètres du thermocycleur.**

**Trois configurations de PCR sont possibles :**

- a) Doubler les volumes indiqués ci-dessus pour obtenir un volume réactionnel de 20  $\mu\text{l}$ .
- b) Ajouter 5  $\mu\text{l}$  eau distillée (15  $\mu\text{l}$  au total).
- c) Recouvrir le mélange PCR de 5  $\mu\text{l}$  d'huile minérale (15  $\mu\text{l}$  au total).

##### Lightcycler 2.0

**Avec le système LC 2.0 de Roche, une couleur de référence (ROX) doit être utilisée pour que l'instrument reconnaisse les tubes réactionnels (capillaires).**

La concentration finale dans le volume de réaction de 10  $\mu\text{l}$  doit être de 120 nM. Il est recommandé de remplacer le volume d'eau distillée (5  $\mu\text{l}$ ) par la pré-dilution de ROX (240 nM).

En cas de préparation d'un prémélange composé d'amorces Q, de mélange Plex et d'eau distillée pour plusieurs échantillons, 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 (s)	Température (°C)	Vitesse de rampe (°C/s)	Lecture de la plaque	Cycles
Activation initiale	120	96	2,5	-	1
Dénaturation	5	98	2,5	-	13
Hybridation + extension	25	68	2,2	-	
Dénaturation	5	98	2,5	-	37
Hybridation + extension	25	68	-	oui	

**Les thermocycleurs** en temps réel suivants **ont été validés** pour la trousse **FastQ B\*27** :

- Biorad : système de détection de PCR en temps réel CFX96™, utiliser les paramètres par défaut

**Recommandation pour les thermocycleurs testés mais non validés**

- Pour le système LightCycler® 480 II (2ème génération) une compensation de couleur doit être réalisée (*Colour Compensation* fournie sur demande, sans surcoût, par la société BAG Diagnostics).
- Avec le thermocycleur Rotor-Gene Q, le volume de réaction doit être défini à 20 µl dans les paramètres du système. La fonction « Utiliser la correction de la pente pour le bruit » peut être activée pour analyser les données.

**6.4 Interprétation des résultats**

Tous les tests réalisés sur de l'ADN génomique humain doivent présenter un signal de fluorescence dans le canal vert (FAM) produit par le contrôle interne. Les échantillons positifs pour l'allèle HLA B\*27 présentent un signal positif dans le canal CAL Fluor Orange 560. Le canal rouge (CAL Fluor Red 610) donne un signal positif avec les allèles B\*27:06 et B\*27:09 détectés indépendamment.

Fluorophore	Common*	Well documented*	Rare*
CAL Fluor Orange 560 (B*27 positif)	B*27:02:01:01, *27:03, *27:04:01, *27:05:02:01, *27:06:01:01, *27:07:01, *27:08,	B*27:01, *27:05:03, *27:09, *27:10, *27:12, *27:14, *27:15, *27:17, *27:19:01:01, *27:20, *27:24, *27:27	B*27:02:01:02-*27:02:01:05, *27:04:02-*27:04:06, *27:05:02:02- *27:05:02:20, *27:05:04-*27:05:46, *27:06:01:02, *27:07:02-*27:07:06, *27:11, *27:13, , *27:19:01:02, *27:21, *27:25, *27:26, *27:28 , *27:30-*27:74, *27:76, *27:79-*27:84, *27:86-*27:91, *27:93 - *27:118, *27:120-*27:128, *27:130-*27:152, *27:154-*27:156, *27:158-*27:188, *27:190-*27:203, *27:205-*27:221 / B*44:97
CAL Fluor Red 610 (B*27:06, *27:09 positif)	B*27:06:01:01	B*27:09	B*27:06:01:02, *27:41, *27:91, *27:106, *27:136, *27:154, *27:192, *27:208 / B*15:129, B*15:395 / B*18:02:01, B*18:179

(\* Fréquences alléliques, référence : IMGT Database 3.38.0).

Les signaux d'amplification des contrôles négatifs (B\*27 négatif) doivent se situer en dehors des valeurs de Cq définies pour les deux canaux. Un contrôle négatif à l'eau distillée ne doit présenter aucun signal de fluorescence pendant toute la série de RT-PCR et constitue un contrôle de contamination. La présence d'un signal de fluorescence dans la plage de valeurs de Cq définies indique une contamination du contrôle négatif à l'eau distillée. La présence de signaux de fluorescence en dehors des valeurs de Cq définies peut survenir en raison de la grande sensibilité de la méthode de test en cas de pipetage inexact. Dans ce cas, le test doit être répété.

Les signaux suivants sont considérés positifs.

	<b>Fluorophores</b>	<b>Valeur Cq</b>	<b>Longueur d'onde en nm</b>
Contrôle positif interne	FAM	≤ 20	Excitation : 495 Émission : 520
B*27 positif	CAL Fluor Orange 560 (HEX)	≤ 25	Excitation : 538 Émission : 559
B*27:06 positif, B*27:09 positif	CAL Fluor Red 610 (RED)	≤ 20	Excitation : 590 Émission : 610

## 7. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

La trousse **FastQ B\*27** est conçue pour une utilisation de diagnostic *in vitro* et doit être manipulée uniquement par du personnel qualifié et formé. Toute utilisation doit respecter les bonnes pratiques de laboratoire.

Les matériels 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 matériels biologiques (ne pas pipeter à la bouche, utiliser des gants jetables pour manipuler les matériels 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 matériels potentiellement infectieux doit être ramassé immédiatement avec du papier absorbant, et les zones contaminées doivent être nettoyées avec un désinfectant classique adapté ou avec de l'alcool à 70 %.

Les équipements 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-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com).

## 8. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DES PERFORMANCES

L'association des amorces et des sondes garantit une identification fiable des allèles B\*27 précisés au chapitre 6.4. 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 FastQ B\*27 a porté sur un total de 95 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	Total étude interne	Pourcentage de concordance (%)
B27 négatif	84	100
B27 positif	11	100
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>100</b>

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

## 9. LIMITES DE LA MÉTHODE

Du fait de la grande sensibilité de la méthode de RT-PCR aux contaminations croisées, 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 FastQ B\*27 ont montré qu'une variation de quantité de l'ADN utilisé pour l'amplification entre 2 ng et 50 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 par des amplicons ou de l'ADN. Il est fortement recommandé de réaliser régulièrement des tests de contamination (p. ex., BAG Wipe Test, **RÉF** 7091) et d'utiliser des contrôles négatifs à l'eau distillée dans chaque série d'analyse.

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

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

## 10. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Le contrôle qualité interne des nouveaux lots de trousse FastQ B\*27 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.








## 11. GESTION DES INCIDENTS

Symptôme	Raison possible	Solution éventuelle
<b>Signal faible ou absent</b>	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 RT-PCR	Utiliser des matériels en plastique compatibles et de bonne qualité (voir le chapitre 4.3)
	Calcul erroné du signal 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)
<b>Présence d'un signal dans le contrôle négatif</b>	Évaporation des réactifs en raison d'une fermeture incorrecte des tubes PCR	Vérifier que les tubes PCR sont bien fermés Veiller aux bords des films étanches
	Contamination du contrôle négatif par de l'ADN	Préparer un nouveau contrôle négatif Décontaminer la paillasse

## 12. MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT

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

### 13. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS SUR LES EMBALLAGES

	Quantité suffisante pour réaliser n tests
	Température de conservation / Limite inférieure de température
	Date de péremption
	Consulter la notice utilisateur
	Fabricant
<b>CONT</b>	Contenu, contient
<b>GENOTYPING</b>	Usage prévu : typage de marqueurs génétiques humains associés à des maladies ou des réactions pharmacogénétiques.
<b>IFU</b>	Notice utilisateur
<b>IVD</b>	Pour usage de diagnostic <i>in vitro</i>
<b>LOT</b>	N° de lot
<b>Q Primermix   B27</b>	Mélange d'amorces pour le typage de l'allèle HLA B*27 avec la trousse FastQ B*27
<b>PLEX MIX</b>	Mélange initial pour la RT-PCR
<b>REF</b>	Code produit

### 14. 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, veuillez consulter notre site Internet à l'adresse <http://www.bag-diagnostics.com>, nous contacter en écrivant à [info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com) ou téléphoner au +49 (0)6404-925-125