Mode d'emploi

Olerup SSP®
avec Taq polymérase

Pour le diagnostic *In Vitro* uniquement

INDICATIONS

Les kits de typage HLA *Olerup* SSP® sont des kits de diagnostic *in vitro* pour effectuer le typage des allèles HLA de Classe I ou de Classe II. Ces réactifs sont utilisés en milieu médical par des professionnels formés pour déterminer le phénotype HLA à partir d'ADN.

RESUME ET EXPLICATION

Historiquement, la méthode utilisée pour la détermination des antigènes leucocytes humains (HLA) était le test de lymphocytotoxicité. Toutefois, en raison du taux d'erreur important et du manque de résolution allélique, cette technique a été remplacée par des méthodes de typage d'ADN utilisant la réaction de PCR (polymerase chain reaction). Dans la plupart des cas, la réaction de PCR est uniquement utilisée comme phase d'amplification de l'ADN cible. Une phase de post-amplification est alors nécessaire pour discriminer les différents allèles. Au contraire, dans la méthode de PCR-SSP (sequence-specific primer – amorces de séquences spécifiques), la discrimination entre les différents allèles s'effectue pendant la PCR. L'étape de post-amplification est ainsi réduite à une simple étape de détection sur un gel d'électrophorèse. Les résultats du test SSP sont liés à la présence de bandes de tailles spécifiques, évitant ainsi une interprétation complexe des résultats. En outre, son haut niveau de résolution en fait actuellement la technique la plus performance car chaque paire d'amorce définit sur le même chromosome deux motifs de séquence positionnés en *cis*. De plus, la nature synthétique des réactifs SSP permet d'améliorer la stabilité et de limiter les variations inter lot.

PRINCIPE

La technique de PCR-SSP est basée sur le principe que seules sont amplifiées les séquences d'ADN complémentaires des amorces spécifiques utilisées grâce à des polymérases ADN type thermostable sans activité correctrice. Ces couples d'amorces spécifiques sont conçus pour être spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles selon le degré de résolution du kit utilisé. Dans des conditions très précises de PCR, les couples d'amorces hybridées ou presque totalement hybridées permettent l'amplification (résultat positif), tandis que les paires d'amorces non hybridées ne donnent pas d'amplification (résultat négatif).

Après la PCR, les fragments d'ADN amplifiés sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose, visualisés par colorisation au bromure d'éthidium sous lumière UV, puis photographiés et interprétés. L'interprétation des résultats de PCR-SSP se base sur la présence ou l'absence de produit(s) spécifique(s) de PCR. La taille relative du/des produits de PCR spécifiques est utile dans l'interprétation des résultats. La technique de PCR-SSP dans le cadre du HLA a été décrite pour la première fois par O. Olerup en 1991 et 1992[1,2].

De nombreux facteurs peuvent affecter l'efficacité de la PCR (par exemple erreurs de pipetage, concentration d'ADN trop faible, mauvais indice de pureté de l'ADN,

présence d'inhibiteurs, précision du thermocycleur). Une paire d'amorces de contrôle interne positif est intégrée dans chaque puits[2]. Celle-ci correspond à des régions conservées du gène d'hormone de croissance humaine, présent dans tous les échantillons d'ADN humain. En présence d'un produit de PCR spécifique de l''allèle/des allèles HLA, le produit de la bande de contrôle interne positif peut être faible ou absent. Les amplicons générés par les paires d'amorces HLA spécifiques ont une taille plus petite que celle du contrôle interne positif, mais plus importante que les amorces non incorporées (voir Valeurs attendues).

REACTIFS

A. Présentation

Les kits de typage *Olerup* SSP® contiennent des amorces de séquence spécifique lyophilisées et optimisées pour l'amplification par PCR des allèles HLA et du gène d'hormone de croissance humaine, du Master Mix PCR avec *Taq* polymérase ("Master Mix"), des films adhésifs et la broche Mode d'emploi élémentaire.

Les solutions d'amorces sont pré-aliquotées et lyophilisées dans des barrettes de tubes PCR de 0,2 ml aux parois minces. Chaque tube contient une solution d'amorces lyophilisées spécifiques de groupe d'allèles, ainsi qu'une paire d'amorces de contrôle interne positif correspondant aux séquences non allèliques, prêt à recevoir l'échantillon d'ADN, le Master Mix et l'H_2O.

Les amorces sont conçues pour une amplification optimale par la PCR lorsqu'elles sont utilisées avec le Master Mix et le programme d'amplification recommandé (voir Programmation du thermocycleur).

Les tableaux Spécificité et Interprétation spécifiques au lot ou la fiche technique pour les allèles HLA amplifiés par chaque mélange d'amorces peuvent être téléchargés sur la page Web https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/.

B. Avertissements et précautions d'utilisation

1. Pour le diagnostic *In Vitro* uniquement.
2. Ce réactif ne peut pas être utilisé comme unique base d'une prise de décision clinique.
3. *Risques biologiques :* Tous les produits contenant du sang doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux. Aucune méthode d'analyse connue à ce jour ne peut garantir que les produits dérivés du sang humain ne transmettront pas d'agents infectieux.
4. *Risques biologiques :* Le bromure d'éthidium utilisé pour la coloration de l'ADN lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose est cancérigène. Porter systématiquement un équipement de protection approprié lors de sa manipulation.
5. *Attention :* Porter des lunettes de protection anti UV et ne pas regarder directement la source lumineuse pendant l'observation ou la photographie des gels.

6. ***Il est interdit*** d'utiliser pour les manipulations ***pré***-PCR les pipettes et autre matériel utilisés pour les manipulations ***post***-PCR.
7. Pour des informations plus détaillées, se reporter à la Fiche de sécurité (http://www.olerup-ssp.com).

C. Mode d'emploi

Se reporter au Mode d'emploi.

D. Mode de conservation

Conserver les composants du kit à l'abri de la lumière, à la température indiquée sur l'emballage.
À utiliser avant la date de péremption indiquée sur l'emballage.

E. Purification ou traitement requis pour l'emploi

Se reporter au Mode d'emploi.

F. Indications d'instabilité

1. Ne pas utiliser des plaques dont les puits présentent des fissures ou dont le bord supérieur est endommagé, ces défauts pouvant provoquer une évaporation au cours de l'amplification. Ne pas utiliser les barrettes de bouchons PCR fissurées car cela peut provoquer une évaporation au cours de l'amplification.
2. Les lyophilisats contenus dans les puits doivent être de couleur rouge. Une décoloration jaune indique une dégradation.
3. Le Master Mix doit être rouge à violet. Une décoloration jaune à orange indique une dégradation.

INSTRUMENT NECESSAIRE

A. Instrument

Le thermocycleur utilisé doit présenter les caractéristiques minimums suivantes :

- couvercle chauffant à une température de 104°C pour un fonctionnement sans huile
- bloc échantillons (aluminium, argent ou argent plaqué or) à utiliser avec une plaque PCR de 96 puits ou des tubes PCR de 0,2 ml à parois minces
- Les kits Olerup SSP ont été validés sur les cycles suivants :
  Vitesses de rampe recommandées :
  - GeneAmp 9700 : Thermocycleur GeneAmp 9700 réglé sur le mode 9600. Cela correspond à une **vitesse de rampe échantillon** de 1,6°C/s vers le haut et de 0,8°C/s vers le bas.
  - Bloc de puits ProFlex 1x96 : Thermocycleur ProFlex PCR avec une vitesse de rampe de bloc de 3,0°C/s (chaque étape 3,0°C/s). Une **vitesse de rampe de bloc** de 3,0°C/s correspond à une vitesse de rampe échantillon de 1,52°C/s vers le haut et de 1,36°C/s vers le bas.
  - Bloc de puits ProFlex 2x96 : Thermocycleur ProFlex PCR avec une vitesse de rampe de bloc de 3,0°C/s (chaque étape 3,0°C/s). Une **vitesse de rampe de bloc** de 3,0°C/s correspond à une vitesse de rampe échantillon de 1,9°C/s vers le haut et de 1,6°C/s vers le bas.

  Remarque : Des vitesses de rampe plus élevées que l'équivalent à décrire peuvent avoir un impact sur les résultats de typage. Notez également que l'impact sur le typage peut varier d'un thermocycleur non validé à l'autre selon le paramétrage.
- plage de température de 4,0°C à 99,9°C
- température précise à ±0,25°C sur une plage de 35°C à 99,9°C
- uniformité de température du bloc échantillon ≤0,75°C pour une plage de température comprise entre 55°C et 95°C
- étalonnage de la température selon une norme de référence (NIST)

Programmer le thermocycleur avec les Paramètres de cycle PCR indiqués dans la section B ci-dessous.

Pour toute information spécifique au thermocycleur, se reporter au manuel fourni par le fabricant. Les thermocycleurs doivent être étalonnés selon les normes d'accréditation ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) ou EFI (Fédération européenne d'immunogénétique).

Programmer le thermocycleur avant de démarrer le Mode d'emploi décrit ci-dessous.

B. Programme d'amplification

1.	1 cycle	94°C	2 min	dénaturation
2.	10 cycles	94°C	10 sec.	dénaturation
		65°C	60 sec.	annealing et extension
3.	20 cycles	94°C	10 sec.	dénaturation
		61°C	50 sec.	annealing
		72°C	30 sec.	extension
4.	Fin - conservation	Temp. Ambiante		si moins de 8 heures
		4°C		si plus de 8 heures

Volume de réaction total dans chaque puits : 10 µl.

Le même programme d'amplification est utilisé pour tous les kits *Olerup* SSP®.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Pour les typages SSP, il est nécessaire d'utiliser de l'ADN extrêmement pur. Les échantillons d'ADN utilisés pour le typage HLA par PCR-SSP doivent être resuspendus dans dH_2O. Le ratio $A_{260/280}$ mesuré par un spectrophotomètre UV doit être compris entre 1,6 et 2,0 pour une visualisation optimale de la bande par électrophorèse.

Il est recommandé d'effectuer une extraction d'ADN automatisée avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA. Utiliser un tube de prélèvement contenant de l'ACD comme anti coagulant.

L'ADN peut également être extrait de toute autre manière produisant de l'ADN pur. Lorsque d'autres méthodes sont utilisées, la concentration en ADN doit être ajustée à 30 ng/ µl. ***Ne pas utiliser de sang hépariné avec ses méthodes.***

Concentration d'ADN recommandée avec :
ADN extrait par EZ1, 15 ng/µl.
ADN extrait par d'autres méthodes, 30 ng/µl.

Une concentration supérieure à 50 ng/µl augmentera le risque d'amplification non spécifique et de bande supplémentaire faible, particulièrement pour les typages SSP haute résolution de Classe I. Si nécessaire, diluer l'ADN extrait dans de l'eau.

Les échantillons d'ADN ne doivent pas être resuspendus dans des solutions contenant des agents chélateurs tel que l'EDTA à une concentration supérieure à 0,5 mM.

Les échantillons d'ADN peuvent être utilisés immédiatement après extraction ou stockés à +4°C pendant 2 semaines sans que cela n'affecte les résultats. Les échantillons d'ADN peuvent être stockés à une température inférieure ou égale à -20°C pendant 9 mois. Contrôler l'indice de pureté et la concentration des échantillons d'ADN extraits s'ils sont stockés pendant une période prolongée avant d'effectuer le typage HLA.

Les échantillons d'ADN doivent être expédiés à une température inférieure à +4°C afin de préserver leur intégrité pendant le transport.

MODE OPERATOIRE

A. Matériel fourni

1. Plaques de typage *Olerup* SSP®.
2. Master Mix (fourni en quantité suffisante pour le nombre de plaques). Le même Master Mix est utilisé pour tous les kits *Olerup* SSP®.
3. Films adhésifs (fournis en quantité suffisante pour le nombre de plaques).
4. Brochure Mode d'emploi élémentaire.

B. Matériel nécessaire mais non fourni

1. Kit d'extraction manuel ou automate d'extraction d'ADN
2. Spectrophotomètre UV
3. Pipettes. Il est recommandé d'utiliser un distributeur électronique distribuant 10 µl pour ajouter le mélange ADN - Master Mix - H_2O.
4. Embouts de pipettes jetables
5. Tubes en polypropylène
6. Vortex
7. Microcentrifugeuse
8. Support de plateau PCR
9. Thermocycleur avec couvercle chauffant adapté aux plaques de 96 puits, avec un gradient de température dans le bloc de chauffage ≤ 0,75°C et un plateau/réceptacle pour puits de réaction de 0,2 ml à parois minces.
10. Four à micro-ondes ou plaque chauffante pour préparer l'agarose
11. Agarose pour électrophorèse (FMC Seakem LE, par exemple)
12. Tampon TBE 0,5 x ; Tampon TBE 1 x (Tris-borate 89 mM, EDTA disodique 2 mM, pH 8,0)
13. Flacon de bromure d'éthidium avec compte-goutte, Référence 103.301-10
14. Pipette multicanaux. Il est recommandé d'utiliser une pipette de 8 canaux, volume ajustable de 5 à 25 µl
15. Marqueur de taille d'ADN 50 à 1 000 bp, par ex. Echelle de marqueur 100 paires de base, Marqueur de taille ADN Référence 103.202-100 ou Marqueur de taille ADN pour petit gel 103.203-100
16. Système de cuve à électrophorèse et générateur
17. Transilluminateur UV
18. Appareil photographique ou système de capteur d'image

C. Procédure pas à pas

Se reporter au Mode d'emploi.

MODE D'EMPLOI

A. Préparation de l'échantillon

1. Extraire l'ADN génomique à partir d'un échantillon de leucocytes avec la méthode de votre choix. Se reporter au paragraphe Prélèvement et préparation des échantillons ci-dessus.
2. Pour toute information spécifique sur la préparation et la conservation des échantillons, se reporter au paragraphe Prélèvement et préparation des échantillons ci-dessus.
3. Procéder à l'amplification de l'échantillon d'ADN purifié avec la plaque de typage *Olerup* SSP® ou conserver l'échantillon d'ADN jusqu'au moment du typage.

B. Préparation des réactifs et du matériel

1. Programmer le thermocycleur suivant le programme PCR *Olerup* SSP®, se reporter au chapitre Instruments requis - Programme d'amplification ci-dessus.
2. Préparer le gel d'électrophorèse, voir chapitre C – **Electrophorèse sur gel Préparation** ci-dessous.

C. Électrophorèse sur gel - Préparation

Pour le système *Olerup* SSP® Gel System 96 (Référence 103.101-01)

1. Installation
   - Régler l'horizontalité de la chambre de préparation pour 1 gel (Référence 103.101-31) ou la chambre de préparation pour 3 gels (Référence 103.101-33) à l'aide du niveau à bulles et des trois pieds réglables.
   - Placer le/les plateaux de gel dans la chambre de préparation.
2. Préparer le gel d'agarose à 2%

   Utiliser de l'agarose pour électrophorèse de haute qualité, permettant de séparer des fragments de 50 à 2 000 paires de base.
   - Pour 5 ml de tampon TBE 10 x (Tris Borate EDTA) ajouter 150 ml d'eau distillée et 2 g d'agarose dans un flacon de verre de 500 ml.
   - Dissoudre l'agarose en le faisant bouillir dans un four à micro-ondes jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution homogène.
   - Laisser la solution de gel dissoute refroidir à 60°C.
   - Colorer le gel avec du bromure d'éthidium (10 mg/ml), 5 µl pour 100 ml de solution de gel. Pour une manipulation plus facile, utiliser nos flacons compte-gouttes de bromure d'éthidium (Référence 103.301-10). **Remarque : Le bromure d'éthidium est cancérigène. Porter systématiquement un équipement de protection approprié lors de sa manipulation.**
   - Pour 100 ml de solution de gel dans le plateau de gel de la chambre de préparation. Placer 6 peignes (Référence 103.101-21) dans les fentes du plateau à gel.
   - Laisser le gel solidifier pendant 15 minutes environ.

- Verser 750 ml de tampon TBE 0,5 X dans la cuve. Plonger le plateau de gel et enlever délicatement les peignes.

Si d'autres systèmes d'électrophorèse sont utilisés, suivre les instructions du fabricant. Pour pouvoir être utilisés avec les kits de typage HLA *Olerup* SSP®, ces systèmes doivent être capables de séparer des produits PCR de 50 à 1 100 paires de base.

D. Procédure détaillée

1. Mettre les échantillons d'ADN, la/les plaque(s) de typage et le volume de Master Mix nécessaires pour le/les échantillons d'ADN/plaque(s). à température ambiante (20 à 25°C).

Le même Master Mix est utilisé pour tous les kits *Olerup* SSP®.

2. Vortexer brièvement le/les échantillons.
3. Placer la/les plaque(s) dans le thermocycleur.
4. **Kits basse et haute résolution**
   - Vortexer le Master Mix avant de pipeter.
   - À l'aide d'une pipette manuelle à simple canal, ajouter à température ambiante le Master Mix et l'H_2O dans un tube de 0,5 ml ou 1,5 ml. (Voir le tableau 1 ci-dessous pour préparer les quantités appropriées.)
   - Boucher le tube, passer au vortex pendant 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube pour faire descendre tout le liquide au fond du tube.
   - À l'aide d'une pipette, déposer 8 µl de mélange Master Mix – dH_2O et 2 µl d'eau dans le puits contrôle négatif.
   - Puis à l'aide d'une pipette, ajouter à température ambiante l'échantillon d'ADN au mélange Master Mix – H_2O. (Voir le tableau 1 ci-dessous pour préparer les quantités appropriées.)
   - Boucher le tube, passer au vortex pendant 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube pour faire descendre tout le liquide au fond du tube.
   - A l'aide d'une pipette électronique, distribuer 10 µl de mélange réactionnel contenant l'échantillon dans chaque puits, sauf le puits du contrôle négatif.

Tableau 1 : Tableau de préparation pour l'utilisation du Master Mix.

Nombre de puits par test	Volume de Master Mix (µl)	Volume de l'échantillon ADN (µl)	Volume d'H_2O (µl)
2	12	8	20
3	15	10	25
4	18	12	30
5	21	14	35
6	24	16	40
7	27	18	45
8	30	20	50
9	33	22	55
10	36	24	60
11	39	26	65
12	42	28	70
13	45	30	75
14	48	32	80
15	51	34	85
16	54	36	90
17	60	40	100
18	63	42	105
19	66	44	110
20	69	46	115
21	72	48	120
22	75	50	125
23	78	52	130
24	81	54	135

Nombre de puits par test	Volume de Master Mix (µl)	Volume de l'échantillon ADN (µl)	Volume d'H_2O (µl)
25	87	58	145
26	90	60	150
27	93	62	155
28	96	64	160
29	99	66	165
30	102	68	170
31	105	70	175
32	108	72	180
36	126	84	210
40	138	92	230
44	150	100	250
48	162	108	270
52	174	116	290
56	186	124	310
60	198	132	330
64	210	140	350
68	228	152	380
72	240	160	400
76	252	168	420
80	264	176	440
84	276	184	460
88	288	192	480
92	300	200	500
96	312	208	520

Les volumes recommandés, figurant sur la liste ci-dessus, tiennent compte du volume permettant de compenser les variations de pipetage et la perte de liquide sur les parois internes des tubes.

5. **Combi kits A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ et DQA-DQB-DR Enhanced ainsi que le kit HLA-C haute résolution**
   - Agiter le Master Mix et vortexer.
   - A l'aide d'une pipette, ajouter à température ambiante 520 µl d'H_2O dans le tube de 1,5 ml fourni contenant 312 µl de Master Mix.
   - Boucher le tube, passer au vortex pendant 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube pour faire descendre tout le liquide au fond du tube.
   - À l'aide d'une pipette, ajouter 8 µl de mélange Master Mix – dH_2O et 2 µl d'eau dans le puits de contrôle négatif N° 96.
   - À l'aide d'une pipette, ajouter à température ambiante 206 µl d'échantillon d'ADN dans le mélange Master Mix – dH_2O.
   - Boucher le tube, passer au vortex pendant 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube pour faire descendre tout le liquide au fond du tube.

- A l'aide d'une pipette électronique, distribuer 10 µl de mélange réactionnel contenant l'échantillon dans chaque puits, sauf dans le puits du contrôle négatif N° 96.

Important :

Veiller à ce que l'échantillon soit bien déposé sur les amorces lyophilisées au fond de chaque tube PCR pour éviter toute contamination croisée entre les puits. Appuyer l'extrémité de la pipette contre la paroi intérieure pour permettre à l'échantillon de glisser jusqu'au fond du puits. Avant de commencer la PCR, vérifier que tous les échantillons sont bien descendus au fond de chaque puits. Sinon, tapoter légèrement la plaque sur la paillasse pour que tout le volume se dépose au fond du puits.

6. Couvrir la/les plaque(s) à l'aide de la feuille adhésive fournie. Vérifier que tous les tubes PCR sont totalement recouverts afin d'éviter l'évaporation pendant l'amplification. Le tampon de compression *Olerup* SSP® Compression Pad (Référence 103.505-06) peut être déposé sur le film adhésif pour éviter toute évaporation pendant le cycle d'amplification.
7. Placer la/les plaque(s) dans le thermocycleur à l'aide d'un adaptateur tube-plateau. Le délai entre la distribution des échantillons et le début du programme de l'amplification ne doit pas excéder 5 minutes.
8. Au moment de lancer le programme *Olerup* SSP®, préciser le volume réactionnel de 10 µl.
9. Le programme d'amplification dure environ une heure et vingt minutes.
10. Enlever la/les plaques du thermocycleur. Contrôler la plaque pour s'assurer que chaque tube contient approximativement le même volume. Effectuer l'électrophorèse des échantillons. Se reporter au chapitre E - Electrophorèse sur gel, ci-dessous. Interpréter les résultats de typage avec le ***Tableau de Spécificité et la table d'interprétation spécifique du lot ou à l'aide de la Fiche technique (Worksheet)***. Voir Valeurs attendues ci-dessous.

E. Electrophorèse sur gel

1. Après avoir terminé l'étape d'amplification, orienter la plaque. Choisir l'ordre d'orientation des puits sur le gel, par exemple de gauche à droite et de bas en haut.
2. Retirer délicatement le film adhésif en évitant les projections de produits de PCR.
3. Déposer directement tout le volume de produits PCR sur le gel d'agarose à 2%. (Il n'est pas nécessaire d'ajouter de tampon de transfert de gel.) Il est recommandé d'utiliser une pipette à 8 canaux.
4. Déposer un marqueur de taille d'ADN (Échelle de marqueur 100 paires de base, Marqueur de taille ADN Référence 103.202-100 ou Marqueur de taille ADN pour petit gel 103.203-100) dans un puits par ligne.
5. Mettre le couvercle de la cuve.
6. Effectuer l'électrophorèse du gel dans le tampon TBE 0,5 x, sans re-circulation, pendant 15 à 20 minutes à 8-10 V/cm.
7. Transférer le plateau de gel avec le gel sur un transilluminateur UV.
8. Photographier le gel avec ou sans le plateau.
9. Identifier la photographie du gel selon le système utilisé au laboratoire.

CONTROLE QUALITE

Les directives d'analyses HLA ASHI exigent qu'un contrôle négatif (contrôle de contamination) soit inclus dans chaque préparation de PCR. (Normes pour les Laboratoires accrédités, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Normes finales révisées, approuvées par le Conseil de direction de l'ASHI : 31 août 2007, version finale janvier 2008). Un puits de contrôle négatif est inclus dans tous les kits à partir du lot 01V (le kit DQ low à partir du lot 06Y).

Se reporter au chapitre Interprétation du gel page 14.

RESULTATS

Vous pouvez accéder aux fiches de validation utilisant des lignées cellulaires et au Certificat d'analyse en ligne, https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/.

LIMITES DE LA METHODE

1. La PCR-SSP exige des conditions d'analyse strictement contrôlées pour assurer une amplification discriminatoire adéquate. Se conformer rigoureusement à la procédure décrite dans le Mode d'emploi.
2. L'échantillon d'ADN extrait fournit la matrice pour le processus spécifique d'amplification. L'ADN purifié doit avoir un ratio $A_{260/280}$ compris entre 1,6 et 2,0 pour une visualisation optimale de la bande.
3. L'ensemble du matériel (thermocycleur, pipettes) doit être étalonné selon les recommandations du fabricant.
4. Pour les informations spécifiques de lot, se reporter à la notice spécifique du kit : Informations spécifiques au lot et à la fiche technique (Worksheet) spécifique au lot.

5. En fonction des analyses effectuées et avec trois (3) méthodes d'extraction d'ADN mentionnées dans le tableau ci-dessous les substances suivantes ont été évaluées aux concentrations indiquées. Il a été établi qu'elles n'affectaient pas les performances du test.

Méthode d'extraction	Substance interférente	Concentration interférente*
EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirubine	200mg/L
	Hémoglobine	200 g/L
	Triglycéride	30 g/L
	Protéine	110 g/L
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirubine	200mg/L
	Hémoglobine	200 g/L
	Triglycéride	18,2 g/L
	Protéine	77 - 96 g/L
Gentra PureGene method	Bilirubine	200mg/L
	Hémoglobine	200 g/L
	Triglycéride	18,2 g/L
	Protéine	119 -146 g/L

6. Les plaques de PCR sont physiquement compatibles avec la plupart des thermocycleurs disponibles sur le marché. Se reporter au tableau de compatibilité ci-dessous.
Remarque : Ce tableau n'est communiqué qu'à titre indicatif. Pour les thermocycleurs validés, voir le chapitre Instruments requis - Instrument.

Tableau de compatibilité	
Fabricant	**Thermocycleur**
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	Puits ProFlex 96
	Puits ProFlex 2x96
	Bloc 96 puits Veriti 0,2 ml
	GeneAmp 2700, 2720, 9600
Agilent (Stratagene)	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradient Cycler
Biometra	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
	TGradient/TAdvanced
	TRobot
	TProfessional

Bio-Rad	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
	C1000, S1000
	PTC-2(xx)
	PTC-100 avec bloc 96 puits
Eppendorf	Mastercycler Gradient
	Mastercycler EP Gradient, Pro, Nexus
MWG	Primus 96
	TheQ Lifecycler
Thermo Scientific	Arktik
Techne	Flexigene, TC-412, TC-4000
	Genius, Touchgene, TC-512, TC-5000
	TC-PLUS, Prime, PrimeG, Prime Elite
Thermo Scientific Hybaid	PCR Express, Px2, PxE
	MultiBlock System & MBS
	Omnigene, Omn-E
Gene Technologies	GS1, GS4, GSX
Takara	TP 3000

VALEURS ATTENDUES

A. Analyse des données

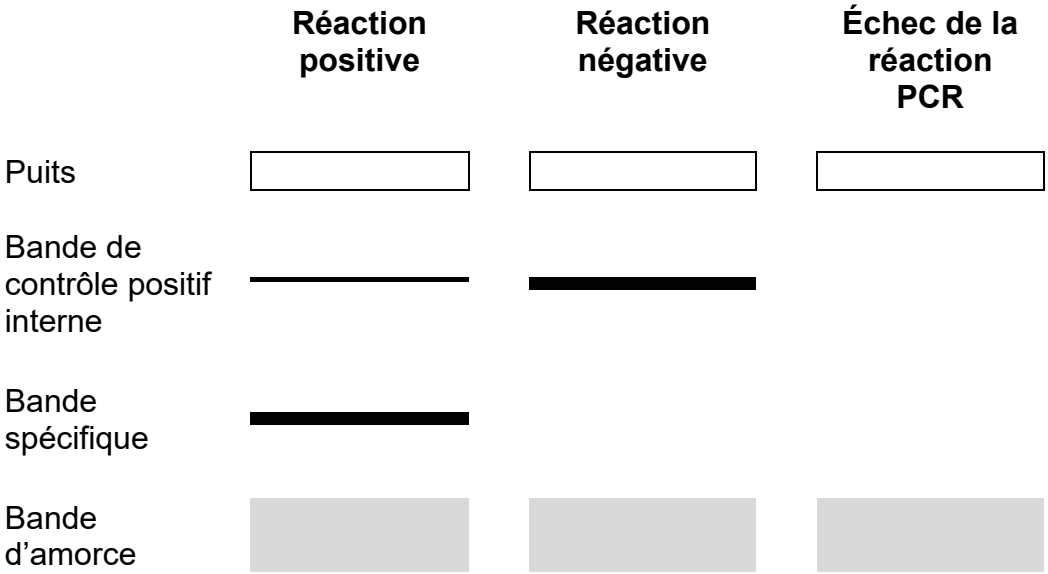
Examiner attentivement la photographie du gel et déterminer les puits positifs.

1. Une bande plus courte à migration plus rapide apparaîtra sur une piste si un/des allèle(s) HLA spécifiques ont été amplifiés. Cela indique un résultat positif.
   a. Enregistrer la présence ou l'absence de produits PCR spécifiques.
   b. Lors de l'interprétation des résultats du gel, il est utile de contrôler la taille relative des produits PCR spécifiques avec celles indiquées sur les tableaux d'interprétation. Plusieurs pistes ont deux (ou plus) longueurs possibles de produits de PCR spécifiques. Ces puits contiennent des paires d'amorces multiples créant des produits PCR de tailles différentes en fonction de l'allèle/des allèles HLA propres à l'échantillon testé.
   c. Rapprocher l'image des produits de PCR spécifiques obtenue avec les informations contenues dans les tableaux de spécificité et d'interprétation spécifiques au lot pour définir le résultat de typage HLA.
2. Une bande de contrôle interne positif de haut poids moléculaire et de migration plus lente, doit apparaître sur chaque piste à l'exception de la piste du contrôle négatif, pour confirmer la parfaite amplification. La bande de contrôle interne peut être faible ou absente pour les pistes positives.

a. Enregistrer la présence et les tailles des bandes de contrôle internes positifs. Les bandes de contrôle ont des tailles différentes ce qui confirme la bonne orientation de la plaque ainsi que l'identification du kit.
b. L'absence de bande de contrôle positif interne sans produit PCR spécifique indique un échec de la PCR.
   i. Si les allèles HLA peuvent être déterminés en présence d'échec PCR et que ceux-ci ne modifient pas l'assignation des allèles, il n'est pas utile de renouveler l'analyse.
   ii. Toutefois, si le/les échecs PCR peuvent modifier l'assignation des allèles HLA, le typage doit être renouvelé.

3. La présence de produit de PCR spécifique ou d'une bande de contrôle interne positif dans une/des pistes de contrôle négatif indique une contamination par un/des produits PCR. Ceci annule tous les résultats du test. Des oligomères d'amorces allant de 40 à 60 paires de base peuvent être observés sur les pistes de contrôle négatif. Cela n'indique pas une contamination.

B. Interprétation du gel



1. Un marqueur de taille d'ADN (Échelle de poids moléculaire de 100 paires de base, Marqueur de taille Référence 103.202-100 ou Marqueur de taille pour petit gel 103.203-100) doit être déposé par ligne de migration ou selon les directives d'accréditation du laboratoire.
2. Il est possible que certaines bandes obtenues soient plus longues que la bande de contrôle interne positif. Ces bandes ne devront pas être intégrées dans l'interprétation des résultats du typage.
3. Les amorces non utilisées formeront une bande diffuse inférieure à 50 paires de base.

4. On peut observer des artéfacts d'oligomère d'amorces qui sont plus longs que la bande d'amorce, mais plus courts que les bandes spécifiques.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES SPECIFIQUES

Contrôle qualité du lot

Chaque solution d'amorce est évaluée par rapport à un panel de 48 échantillons d'ADN provenant de lignées cellulaires bien caractérisées de l'IHWC. Se reporter aux Fiches de validation de lignes de cellules spécifiques du lot dans la notice du produit, informations spécifiques au lot.

Comparatif de méthodes Etude N°1

Il s'agissait d'une étude effectuée pour évaluer l'agrément du kit de typage HLA *Olerup* SSP® DR basse résolution et la Plaque de typage HLA ADN One Lambda Micro SSP™ auprès de trois laboratoires cliniques aux USA.

Les résultats de typage analysés du kit de typage HLA *Olerup* SSP® DR Basse Résolution et de la Plaque de typage HLA DNA One Lambda Micro SSP™ ont montré une concordance de 98,4% (123 / 125 ; 95% CI : 94,3 – 99,8) lorsque deux résultats Olerup ambigus ont été traités comme discordants. La concordance était de 100% (123 / 123 ; 95% CI : 97.1 – 100) lorsque les résultats Olerup ambigus ont été exclus de l'analyse, comme le voudrait une pratique clinique normale.

Comparatif de méthodes Etude N°2

Cette étude a été menée pour démontrer la concordance entre les résultats de typage d'allèles HLA (A, B, C, DQ) basse résolution obtenus avec les kits de typage HLA et d'investigation *Olerup* SSP® et les kits SSO One Lambda LABType. Des échantillons de sang total ACD ont été prélevés sur 95 sujets répartis sur trois sites cliniques aux USA. Une extraction d'ADN a été réalisée et l'ADN purifié ainsi obtenu a été analysé avec les méthodes d'investigation HLA Olerup SSP® et la référence, One Lambda LabType SSO.

La concordance globale pour les allèles de Classe I était de 99,6% (278 / 279 ; 95% CI : 98,0 - 100). Pour les allèles de Classe II, la concordance était de 100% (94 / 94 ; 95% CI : 96,2 – 100).

Tableau 1
Concordance globale entre les résultats Olerup SSP® et OneLambda SSO pour les allèles de Classe I et de Classe II.

	Total	
Locus HLA	**n/N**	**% de concordance (95% CI)**
A	95 / 95	100 (96.2 – 100)
B	90 / 90	100 (96,0 – 100)
C	93 / 94	98,9 (94,2 – 100)
Tous Loci de Classe I	278 / 279	99,6 (98,0 – 100)
Loci Classe II (DQ)	94 / 94	100 (96.2 – 100)

Etude de reproductibilité des résultats du kit.

Cette étude avait pour but de comparer les résultats de typage HLA obtenus avec le kit *Olerup* SSP® avec trois laboratoires d'analyses HLA utilisant un panel de 10 échantillons d'ADN bien caractérisés dont les résultats de consensus étaient inclus dans la Banque UCLA d'ADN HLA pour les HLA de Classe I (A, B et C), les allèles communs de Classe II (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* et DQB1*) et les allèles de Classe II moins communément analysés (DQA1*, DPA1* et DPB1*).

Tableau 2 : Résumé des résultats de l'Étude de reproductibilité du kit Olerup SSP® HLA

Type d'allèle HLA	Précision du typage (%) n/N 95% Conf. Intervalle (LL, UL)	
	Résultat ambigu traité comme discordant	*Résultat ambigu traité comme indéterminé et exclu de l'analyse*
Classe I Basse résolution (A et B combinés)	98,3 (59/60) 91,1, 100	100 (59/59) 93,9, 100
Classe I Haute résolution (A, B et C combinés)	94,7 (142/150) 89,8, 97,7	98,6 (142/144) 95,1, 99,8
Classe II Basse résolution (DRB1 et DRB3*/DRB4*/DRB5*)*	100 (60/60) 94,0, 100	100 (60/60) 94,0, 100
Classe II Haute résolution - Allèles communs (DRB1, DRB3*/DRB4*/DRB5* et DQB1*)*	98,3 (118/120) 94,1, 99,8	100 (118/118) 96.9, 100
Classe II Haute résolution Allèles moins couramment analysés (DQA1, DPA1* et DPB1*)*	83,3 (75/90) 74,0, 90,4	86,2 (75/87) 77,2, 92,7

Cette étude a utilisé un panel de dix (10) échantillons d'ADN ayant des résultats de typage HLA bien caractérisés.

Les concordances les plus faibles observées pour les allèles de Classe II Basse résolution moins fréquemment analysés reflètent une plus grande incertitude dans les "résultats de consensus" des échantillons d'ADN UCLA considérant les informations de séquence incomplètes disponibles pour les allèles DQA1*, DPA1* et DPB1*. Pour 9 résultats discordants sur les 11 observés pendant l'étude de reproductibilité (un DQA1*0505 par Olerup SSP® vs. « typage de consensus » DQA1*0501) les trois sites de tests ont abouti au même résultat démontrant la cohérence des performances du kit Olerup DQA1*.

BIBLIOGRAPHIE

1. Olerup O, Zetterquist H. *HLA-DRB1*01* subtyping by allele-specific PCR-amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991: **37**: 197-204.
2. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* 1992: **39**: 225-235.
3. On peut trouver les allèles HLA courants sur :
   a. http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla ou
   b. http://www.anthonynolan.org.uk/HIG

DEPANNAGE

Problème	Cause	Solution
Pas d'amplification (aucun contrôle interne, ni de produits spécifiques).	Quantité d'ADN insuffisante.	Mesurer la concentration d'ADN et vérifier si la quantité d'ADN est correcte. Une contamination d'ARN peut occasionner une surestimation spectrophotométrique de la concentration d'ADN. Refaire l'extraction d'ADN avec des solutions récemment préparées. Il est recommandé d'effectuer une extraction d'ADN automatisée avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA.
	L'ADN contient des inhibiteurs de PCR. Par exemple des protéines ou de l'éthanol (provenant des phases de précipitation), des matrices résiduelles de produits de purification d'ADN en phase solide.	Evaluer la qualité de l'ADN. Il est recommandé d'utiliser un ratio A260/A280 compris entre 1,6 et 2,0 mesuré par spectrophotométrie UV. Suivre attentivement le protocole d'extraction d'ADN du fournisseur. Procéder à une nouvelle extraction d'ADN. Il est recommandé d'effectuer une extraction d'ADN automatisée avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA.
	L'ADN a été extrait sur du sang hépariné.	Utiliser du sang non hépariné ou utiliser des protocoles d'extraction d'ADN pour sang hépariné.
	L'ADN est dissout dans un tampon contenant de l'EDTA.	Renouveler l'extraction d'ADN et dissoudre l'ADN dans dH_2O.

Problème	Cause	Solution
Suite : **Pas d'amplification (aucun contrôle interne, ni de produits spécifiques).**	Introduction accidentelle de chlore dans le test.	Passer en revue les endroits où du chlore a pu être introduit.
	Les kits ne sont pas conservés à la température indiquée.	Conserver les kits à -20°C.
	Le thermocycleur ne fonctionne pas correctement.	Étalonner le thermocycleur et vérifier le programme PCR. Un thermocycleur utilisé régulièrement pour le typage PCR-SSP doit être étalonné tous les 6 à 12 mois.
	Mauvais contact entre le bloc de chauffage du thermocycleur et la plaque de typage.	Utiliser un plateau/réceptacle adapté aux puits de réactions de 0,2 ml à parois minces. Se reporter au manuel du thermocycleur.
Échec aléatoire de l'amplification.	Un film adhésif/des bouchons de tubes PCR non hermétiquement fermés entraînent une évaporation et par conséquent un échec d'amplification.	Vérifier que les films adhésifs et tous les bouchons sont parfaitement fermés. Le tampon de compression *Olerup* SSP® Compression Pad (Référence 103.505-06) peut être déposé sur le film adhésif pour éviter toute évaporation pendant le cycle d'amplification.
	Erreurs de transfert de gel.	Vérifier que le nombre de puits remplis est exact et que chaque puits contient environ le même volume de mélange réactionnel.
	Utilisation de pipettes non étalonnées.	Étalonner régulièrement toutes les pipettes selon les recommandations du fabricant.
	Erreurs de pipetage.	Recommencer en pipetant avec soin.

Problème	Cause	Solution
	Le Master Mix et l'échantillon d'ADN n'ont pas été correctement mélangés avant utilisation.	Vortexer brièvement avant utilisation. Il est recommandé de vortexer après chaque ligne.
	Un volume irrégulier de mélange ADN-Master Mix a été ajouté dans les puits.	Recommencer en pipetant avec soin.
Bandes de contrôle interne faibles.	ADN impur.	Evaluer la qualité de l'ADN. Le ratio $A_{260/280}$ doit être compris entre 1,6 et 2,0 par spectrophotométrie UV. Une contamination d'ARN peut occasionner une surestimation spectrophotométrique de la concentration d'ADN. Un ADN dégradé trouble les pistes du gel. Refaire l'extraction d'ADN avec des solutions récemment préparées. Il est recommandé d'effectuer une extraction d'ADN automatisée avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA.
	Quantité d'ADN insuffisante.	Mesurer la concentration d'ADN et ajuster à 30 ng/µl ou à 15 ng/µl pour l'ADN extrait avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA. Une contamination d'ARN peut occasionner une surestimation spectrophotométrique de la concentration d'ADN. Un ADN dégradé trouble les pistes du gel. Refaire l'extraction d'ADN avec des solutions récemment préparées. Il est recommandé

Problème	Cause	Solution
		d'effectuer une extraction d'ADN automatisée avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA.
Suite : **Bandes de contrôle interne faibles.**	Température d'annealing trop élevée ; le thermocycleur n'est pas étalonné.	Étalonner le thermocycleur et vérifier le programme PCR. Un thermocycleur utilisé régulièrement pour le typage PCR-SSP doit être étalonné tous les 6 à 12 mois.
	Le PCR Master Mix a été conservé à 4°C pendant plus de 2 semaines.	Veiller à respecter les consignes pour la conservation du PCR Master Mix.
Amplification non spécifique (échelles ou trainées).	Utilisation d'un échantillon d'ADN excessif.	Mesurer la concentration d'ADN et ajuster à 30 ng/µl ou à 15 ng/µl pour l'ADN extrait avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA. Certaines solutions d'amorces ont plus tendance à créer une amplification non spécifique. Se reporter aux notes de bas de page de chaque tableau de Spécificité propre au lot.
	ADN impur.	Les fragments plus gros que le fragment de contrôle interne ne doivent pas être intégrés dans l'interprétation des résultats obtenus. Vérifier la qualité de l'ADN. Procéder à une nouvelle extraction d'ADN. Il est recommandé d'effectuer une extraction d'ADN automatisée avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA.

Problème	Cause	Solution
		Certaines solutions d'amorces ont plus tendance à créer une amplification non spécifique. Se reporter aux notes de bas de page de chaque tableau de Spécificité propre au lot.
Signaux d'amplification de plus en plus faibles au cours du temps.	La solution de bromure d'éthidium est trop ancienne.	Préparer une nouvelle solution de bromure d'éthidium pour obtenir une meilleure coloration du gel d'agarose et donc un meilleur signal. Les bandes se détectent plus facilement si la coloration du gel d'agarose est normale.
	L'une des lampes UV est cassée.	Contrôler l'équipement UV. Les nuées d'amorces se détectent facilement si la lumière UV est normale.
	Utilisation d'un échantillon d'ADN insuffisant.	Mesurer la concentration d'ADN et ajuster à 30 ng/µl ou à 15 ng/µl pour l'ADN extrait avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA.
	Température d'annealing trop élevée ; le thermocycleur n'est pas étalonné.	Étalonner le thermocycleur et vérifier le programme PCR. Un thermocycleur utilisé régulièrement pour le typage PCR-SSP doit être étalonné tous les 6 à 12 mois.
Schéma d'amplification anormal.	Utilisation d'un tableau d'interprétation/d'une fiche technique ne correspondant pas au lot.	Vérifiez le numéro de lot du produit utilisé et le tableau d'interprétation / la fiche technique utilisé(e).
	Gel transféré dans le mauvais ordre.	Vérifier l'ordre des tailles des contrôles internes

Problème	Cause	Solution
		sur le gel.
	Le schéma d'amplification contient un faux positif.	Voir ci-dessous.
	Le schéma d'amplification contient un faux négatif.	Voir ci-dessous.
Amplifications de faux positifs.	Contamination de l'ADN.	Utiliser des gants, des embouts de pipettes avec filtres (bouchons filtre) et des pièces distinctes pour les manipulations pré-PCR et post-PCR. Veiller à manipuler les échantillons en toute conformité à chaque étape. Contrôler toute contamination éventuelle en utilisant le kit *Olerup* SSP® Wipe Test.
	ADN impur.	Evaluer la qualité de l'ADN. Suivre attentivement le protocole d'extraction d'ADN du fournisseur. Essayer d'autres systèmes d'extraction d'ADN. Procéder à une nouvelle extraction d'ADN. Il est recommandé d'effectuer une extraction d'ADN automatisée avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA.
	Utilisation d'un échantillon d'ADN excessif.	Mesurer la concentration d'ADN et ajuster à 30 ng/µl ou à 15 ng/µl pour l'ADN extrait avec le Blood System QIAGEN EZ1 DSP DNA.
	Température d'annealing trop faible.	Étalonner le thermocycleur et vérifier le programme PCR. Un thermocycleur utilisé régulièrement pour le

Problème	Cause	Solution
		typage PCR-SSP doit être étalonné tous les 6 à 12 mois.
	Temps d'attente trop long entre la préparation de la PCR et le démarrage du cycle thermique.	Ne pas attendre plus de 5 minutes avant de commencer l'amplification.
	Temps d'attente trop long entre l'insertion des plaques de typage dans le thermocycleur et le démarrage du cycle.	Utiliser un thermocycleur préchauffé.
Suite : **Amplifications de faux positifs.**	Utilisation d'une quantité de bromure d'éthidium excessive.	Utiliser la quantité de bromure d'éthidium recommandée.
	Interprétation erronée d'un artéfact comme bande spécifique.	Vérifier la taille de bande attendue et consulter les notes de bas de page sur le Tableau d'interprétation/la Fiche technique et le Tableau de spécificité du lot.
	Le schéma d'amplification contient un faux positif.	Vérifier que toutes les amplifications spécifiques sont de taille adéquate et s'assurer qu'aucun artéfact (report de dimère d'amorce) n'a été interprété par erreur comme une amplification spécifique.
	Gel transféré dans le mauvais ordre.	Vérifier l'ordre des tailles des contrôles internes sur le gel.
Amplifications de faux négatifs.	Le thermocycleur n'est pas étalonné correctement.	Étalonner le thermocycleur et vérifier le programme PCR. Un thermocycleur utilisé régulièrement pour le typage PCR-SSP doit être étalonné tous les 6 à 12 mois. Si le problème n'a pas été résolu par un réétalonnage, procéder à

Problème	Cause	Solution
		un nouveau typage du test avec un échantillon de référence de même spécificité. S'il est confirmé comme négatif, contacter l'assistance technique.
	Gel transféré dans le mauvais ordre.	Vérifier l'ordre des tailles des contrôles internes sur le gel.
Problèmes de gel d'ordre général (gels flous et/ou pistes troubles).	Echantillon d'ADN dégradé.	Matérialisé par une trainée dans les pistes de gel. Isoler de l'ADN sur un nouvel échantillon.
	Zébrures aléatoires importantes dans les puits.	Suspensions irrégulières d'ADN. Vérifier que l'échantillon d'ADN est bien dissout avant de prendre l'aliquot. Agiter l'échantillon d'ADN dilué au Vortex.
	Le produit PCR flotte et sort du puits.	Aligner soigneusement les embouts de pipettes sur les puits de gel et pipeter doucement.
	Le tampon d'électrophorèse est peut-être trop chaud.	Préparer un nouveau tampon TBE. Travailler avec une tension plus basse.
	Un pourcentage incorrect de gel d'agarose a été utilisé.	Veiller à utiliser un gel d'agarose à 2% comme indiqué.
	Dissolution incomplète de l'agarose.	Faire à nouveau bouillir un court instant pour faire fondre l'agarose.
	Concentration de TBE incorrecte.	Utiliser la concentration de TBE 0,5 x recommandée.
	Gels préparés trop récemment.	Les gels ne peuvent être utilisés que 15 minutes après préparation.
	Gels trop anciens.	Ne pas préparer les gels trop longtemps à l'avance.
	Les peignes du gel utilisé	Utiliser des peignes fins

	ont des fentes trop épaisses.	(4 x 1 mm).
	Le plateau de gel n'est pas transparent aux UV.	Enlever le gel du plateau de gel avant observation.
	Photo du gel trop lumineuse.	Utilisation d'une quantité de bromure d'éthidium excessive. Vérifier les réglages de l'appareil photo.
	Photo du gel trop sombre.	Utiliser la quantité de bromure d'éthidium recommandée. Vérifier les réglages de l'appareil photo.
Problèmes généraux avec une amplification de faux négatifs ou problèmes test-à-test de même nature	Réglage de la vitesse de rampe trop élevé.	Les kits Olerup SSP sont validés à l'aide du thermocycleur GeneAmp 9700 réglé sur le mode 9600 et ProFlex avec une vitesse de rampe de 3°C/s. Des vitesses de rampe plus élevées que l'équivalent peuvent avoir un impact sur les résultats de typage.

MARQUES DEPOSEES UTILISEES DANS CE DOCUMENT/CE PRODUIT

Olerup SSP® est une marque déposée de *CareDx AB*.
Qiagen™ est une marque déposée de QIAGEN.

GARANTIE

CareDx AB garantit ses produits contre tout défaut de matériaux et de conception sous réserve qu'ils aient été utilisés selon les recommandations. Dans le cadre de cette garantie, l'unique obligation de *CareDx AB* consistera à remplacer gratuitement tout produit ne répondant pas aux standards de performances indiqués sur la fiche technique du produit.
Cette garantie s'applique uniquement aux produits qui ont été conservés et manipulés conformément aux recommandations de *CareDx AB*. Elle ne s'applique pas aux produits ayant fait l'objet de modifications, de mauvaise utilisation ou d'abus.
Toute réclamation intervenant dans le cadre de cette garantie doit être adressée à *CareDx AB* par écrit et accompagnée d'une copie de la facture d'achat. Cette garantie remplace toute autre garantie expresse ou implicite, y compris les garanties de qualité marchande ou d'adéquation à un besoin particulier. En aucun cas *CareDx AB* ne pourra être tenu responsable des dommages accidentels ou consécutifs.
Ce produit ne peut pas être reformulé, reconditionné ou revendu de quelque façon que ce soit sans l'accord écrit de *CareDx AB*, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Suède.
Tous les échantillons doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une maladie. Porter impérativement des gants et une protection adaptée à chaque étape de la manipulation.

GARANTIE

CareDx AB garantit que les amorces des plaques de typage *Olerup* SSP® présentent les caractéristiques indiquées sur la fiche technique, les Tableaux de spécificité et d'interprétation et sur la notice du produit du lot.

ADRESSES :

Fabricant :
CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Suède
Tél : +46-8-508 939 00
Fax : +46-8-717 88 18
E-mail : orders-se@caredx.com
Page Web : http://www.labproducts.caredx.com

Distribué par :
CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Suède
Tél : +46-8-508 939 00
Fax : +46-8-717 88 18
E-mail : orders-se@caredx.com
Page Web : http://www.labproducts.caredx.com

CareDx Lab Solutions Inc., 901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tél : 1-877-653-7871
Fax : 610-344-7989
E-mail : orders-us@caredx.com
Page Web : http://www. labproducts.caredx.com

CareDx Pty Ltd., 20 Collie Street, Fremantle WA 6160, Australie
Tél : +61 8 9336 4212
E-mail : orders-aus@caredx.com
Page Web : http://www. labproducts.caredx.com/

Pour toute information sur les distributeurs CareDx dans le monde, contacter CareDx AB.

0409-LBL v02 Kits de typage HLA Olerup SSP® avec Taq polymérase est traduit de la version anglais principale 0192-LBL v04 IFU Olerup SSP HLA typing kit w Taq.

Modifications apportées à la version 0192-LBL v04 par rapport à la version 0192-LBL v03 :
1. Coordonnées révisées.

Modifications apportées à la version 0192-LBL v03 par rapport à la version 0192-LBL v02 :
1. Date de révision ajoutée.
2. Informations relatives aux notices produits spécifiques au lot clarifiées.
3. CareDx Pty Ltd a été ajouté en tant que distributeur.