

"SMART SNP DIRECT"

SMART SNP FVL Direct Kit

Détermination allélique du Facteur V (SNP G1691A Leiden) de la coagulation

REF SNP-D-030**CE IVD****INDEX**

Usage prévu	Page 1
Présentation du Kit	Page 2
Caractéristiques du Kit	Page 2
Matériel inclus dans le Kit	Page 2
Matériel nécessaire non inclus dans le Kit	Page 2
Kits accessoires	Page 3
Avertissements et précautions	Page 3
Echantillons et contrôles	Page 5
Procédure	Page 6
Limitations à la procédure	Page 9
Résolutions des problèmes	Page 11
Bibliographie	Page 13
Plan de travail (schéma)	Page 14

Nota bene : Les échantillons d'ADN génomique sont analysables seulement sur les appareils AriaDx PCR en temp réel Dx– Agilent.

Le produit **SMART SNP FVL Direct Kit (SNPD-030)** fournit les réactifs pour un **dosage qualitatif** destiné à la vérification de la présence des polymorphismes **G1691A Leiden du Facteur V**, utiles à l'évaluation du risque de Thrombose Veineuse Profonde.

Le dispositif **SMART SNP FVL Direct Kit (SNPD-030)** est à utiliser en association avec les produits suivants :

- **SMART SNP Coagulation Factors POSITIVE CONTROL**, contrôle positif d'amplification, constitué d'ADN plasmidique hétérozigote pour le Facteur II et le Facteur V de la Coagulation et pour l'enzyme MTHFR 677 (**Code SNP-D-CF CTRL**).

- **SMART SNP Sample Diluent**, mélange de dilution pour échantillons de sang périphérique. Ce produit s'utilise quand tout le processus pré-analytique (dilution des échantillons et préparation de la microplaque d'amplification) est effectué en utilisant des plateformes automatiques de dispensation (**Code SNP-D-SD**).

Le produit **SMART SNP FVL Direct Kit (SNPD-030)** fournit un système diagnostic *in vitro* qui s'utilise pour la **discrimination allélique** des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) **G1691A Leiden** mutation du gène humain codant le **Facteur V** de la coagulation (prothrombine) dans des échantillons de :

- **Sang périphérique** recueilli en éprouvette avec EDTA, héparine ou citrate de sodium ;
- **ADN génomique** extrait d'échantillons de sang périphérique prélevé en éprouvette avec EDTA, héparine ou citrate de sodium.

Le produit **SMART SNP FVL Direct Kit** doit être utilisé en suivant les instructions reportées dans le manuel et en association avec les appareils et réactifs indiqués.

Toute utilisation non prévue du produit et/ou l'altération des composants annule toute forme de responsabilité de la part de Bioclarma.

PRESENTATION DU KIT

Le dispositif **SMART SNP FVL Direct Kit** utilise un essai "Multiplex", grâce auquel il est possible de définir en un seul test le génotype du SNP G1691A Leiden du gène codant pour le Facteur V de la coagulation.

Le produit **SMART SNP FVL Direct Kit (SNPD-030)** permet aussi d'analyser pendant la même session opérative des échantillons de différente nature. Ceci est validé par l'amplification **DIRECTE** par PCR en temps réel des échantillons de **sang périphérique**, frais ou congelé (après dilution avec le SMART SNP Sample Diluent), et par l'analyse des échantillons d'**ADN génomique**. (Il est rappelé que les échantillons d'ADN génomique sont analysables uniquement sur les appareils AriaDx – Agilent). La procédure basée sur l'utilisation de sang périphérique a l'avantage de limiter les variables expérimentales liées à la phase d'extraction de l'ADN, avec pour conséquence la réduction des temps et coûts de la phase pré-analytique.

CARACTERISTIQUES DU KIT

Le dispositif **SMART SNP FVL Direct Kit (SNPD-030)** permet d'effectuer **96 déterminations**. Le mélange de réaction est fourni en 4 éprouvettes qui contiennent chacune un volume de mélange de réaction suffisant pour 24 réactions d'amplification.

Un kit **SMART SNP FVL Direct Kit (SNPD-030)** fournit les réactifs suffisant pour l'analyse, en une seule répétition et sur une seule microplaque d'amplification de 96 échantillons cliniques, un contrôle positif et un contrôle négatif de réaction.

Le test prévoit que la réaction soit exécutée sur un thermocycleur pour PCR en temps réel, doté d'un système optique de révélation de la fluorescence émise par 2 fluorochromes différents, caractérisés par l'émission à longueurs d'onde différentes.

- Canal **FAM** : pour la révélation de l'allèle *wild type* du Facteur V
- Canal **HEX** : pour la révélation de l'allèle *muté* du Facteur V Leiden.

L'élaboration des données obtenues pendant la session de RT-PCR permet d'évaluer le génotype de l'échantillon (Wild Type, Homozygote Muté ou Hétérozygote) pour les polymorphismes cités.

Le produit **SMART SNP FVL Direct Kit** a été validé pour l'exécution du test diagnostique sur les appareils suivants :

- Appareil BioRad CFX-96 e CFX Connect;
- Appareil Agilent Aria Dx PCR en temps réel System Dx.

Les données complètes des caractéristiques de performance peuvent être demandées à l'adresse e-mail info@bioclarma.com.

MATERIEL INCLUS DANS LE KIT

REACTIF	QUANTITE	COMPOSITION
SMART SNP FVL Master Mix	4 x 220 µl	Mélange de réaction complet et prêt à l'emploi spécifique pour le Facteur V de la coagulation
SMART SNP Sample diluent	5 x 2 ml	Solution optimisée pour la dilution pré-PCR des échantillons de sang entier
Eau Ultrapure	1 x 200 µl	Eau ultrapure pour biologie moléculaire

Le produit **SMART SNP FVL Direct Kit** fournit :

- ③ **SMART SNP FVL Master Mix** : mélange réactionnel prêt à l'emploi pour l'amplification par RT-PCR du Facteur V et du Facteur V de la coagulation. Le mélange contient : tampon de réaction, ions magnésium, nucléotides triphosphates, polymérase Taq, primers et sondes spécifiques pour les déterminations alléliques citées.
- ③ **SMART SNP Sample Diluent** : tampon de dilution nécessaire à la préparation des échantillons de sang entier.
- ③ **Eau Ultrapure** pour Biologie Moléculaire, à utiliser comme Contrôle Négatif de réaction.

MATERIEL NECESSAIRE NON INCLUS DANS LE KIT

- ③ Hotte à flux laminaire.
- ③ Gants à usage unique en latex ou similaire.
- ③ Mélangeur vortex.
- ③ Microcentrifugeuse de paillasse (12.000/14.000 RPM).
- ③ Micropipettes et embouts stériles avec filtre pour aérosols ou à déplacement positif (0,5-10 µl, 2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl).
- ③ Microplaque de 96 puits pour PCR en temps réel et feuillets adhésifs optiques.
- ③ Thermostat programmable avec système optique de relèvement de la fluorescence (thermocycleur pour PCR en temps réel) capable de relever la fluorescence des canaux FAM, HEX.

KIT ACCESSOIRES

Le Contrôle positif hétérozygote d'ADN plasmidique **n'est pas inclus** dans le kit. Il est conseillé d'utiliser les kits accessoires Bioclarma suivants :

- ③ **SMART SNP Coagulation Factors POSITIVE CONTROL (code SNP-DF CTRL)** : solution hétérozygote stabilisée de différents plasmides contenant la séquence pour le polymorphisme G20210A du gène codant pour le Facteur II, la séquence pour le polymorphisme G1691A (R506Q, Leiden) du gène codant pour le Facteur V de la coagulation et la séquence pour le polymorphisme C677T du gène codant pour l'enzyme MTHFR.
- ③ **SMART SNP Sample Diluent (code SNP-SD)** : si vous utilisez des plateformes automatiques. Solution prête à l'emploi destinée à la dilution des échantillons de sang périphérique. La dilution des échantillons de sang doit être effectuée avant la phase d'amplification et a pour but de réduire la présence de substances qui peuvent interférer avec la réaction.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

ATTENTION

En cas d'accident grave, informer Bioclarma s.r.l. (info@bioclarma.com; Tél. +39 0118894474) et l'organisme compétent.

Le kit est destiné à un usage diagnostique *in vitro*.

Les réactifs et les instructions fournis par le kit ont été approuvés pour garantir des prestations optimales. La dilution des réactifs ou l'altération des conditions expérimentales pourraient produire des résultats erronés ou discordants.

Tous les réactifs du kit sont formulés de façon spécifique pour être utilisés en association avec le kit Bioclarma **SMART SNP Coagulation Factors POSITIVE CONTROL (Code SNP-DF CTRL)**.

Dans le cas de l'utilisation d'un système automatique de dispensation il est conseillé d'utiliser le produit **SMART SNP Sample Diluent (Code SNP-SD)**.

Il est déconseillé d'effectuer d'éventuelles substitutions afin de garantir des prestations optimales.

Conseils spécifiques pour la manipulation :

Les procédures de biologie moléculaire, comme l'extraction, la transcription inverse, l'amplification et la révélation des acides nucléiques, requièrent du personnel formé pour éviter les risques de résultats erronés.

En particulier, porter la plus grande attention afin d'éviter :

- ③ des contaminations par des DNases qui pourrait provoquer la dégradation de l'ADN cible;
- ③ une contamination de la PCR par carry-over qui amèneraient à des résultats faux-positifs.

Il est conseillé d'adopter les **précautions** suivantes :

- Utiliser des zones séparées pour l'extraction/préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/révélation des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone dédiée à l'extraction/préparation des réactions d'amplification ;
- Utiliser des blouses, gants et instruments dédiés pour l'extraction/préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/révélation des produits d'amplification. Ne jamais transférer blouses, gants et instruments/appareils de la zone pour l'amplification/révélation des produits d'amplification à la zone pour l'extraction/préparation des réactions d'amplification ;
- Manipuler sous hotte à flux laminaire les échantillons qui doivent être dédiés exclusivement à ce type d'analyse ;
- Eviter l'ouverture de plusieurs éprouvette à la fois;
- Manipuler les échantillons en utilisant des pipettes exclusivement dédiées à cette utilisation ;
- Manipuler les réactifs sous hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés pour être utilisés en une seule session. Les pipettes utilisées pour manipuler les réactifs doivent être exclusivement dédiées à cet usage ;
- Manipuler les produits d'amplification afin de limiter au maximum leur dispersion dans l'environnement pour éviter les risques de contamination. Les pipettes utilisées pour manipuler les produits d'amplification doivent être exclusivement dédiées à cet usage ;
- Toutes les pipettes doivent être du type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre aérosol. Les pointes utilisées doivent être stériles, exemptes de DNase et RNase, d'ADN et d'ARN ;
- Tous les instruments, y compris les hottes à flux laminaire, les thermocycleurs et les pipettes, doivent être régulièrement calibrés et entretenus.

Avertissement et précautions générales :

Les tissus humains doivent être considérés comme s'ils étaient capables de transmettre des infections et donc traités avec les précautions adéquates et en conformité avec les recommandations OSHA et / ou CAP (ou équivalent pour l'UE).

- Eviter le contact direct avec les échantillons biologiques. Eviter de produire des projections ou des aérosols. Le matériel qui entre en contact avec les échantillons biologiques doit être traité avec hypochlorite de sodium dilué à 3 % pendant au moins 30 minutes ou traité en autoclave à 121° C pendant une heure avant d'être éliminé ;
- Manipuler et éliminer tous les réactifs et tous les matériels utilisés pour effectuer le dosage comme s'ils étaient potentiellement infectés. Eviter le contact direct avec les réactifs. Eviter de produire des projections ou aérosols. Les déchets doivent être traités et éliminés selon les règles de sécurité adaptées. Le matériel à usage unique combustible doit être incinéré. Les déchets liquides contenant acides ou bases doivent être neutralisés avant leur élimination ;
- Porter des dispositifs de protection personnelle pour éviter le contact avec les yeux et la peau. Consulter la fiche technique de sécurité des matériels (MSDS) pour plus d'information ;
- Ne pas pipeter à la bouche ;
- Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer de produits cosmétiques dans les aires de travail ;
- Bien se laver les mains après avoir manipulé les échantillons et réactifs ;
- Eliminer les réactifs en plus et les déchets selon les normes en vigueur ;
- Lire toutes les instructions fournies avec le kit avant d'effectuer le dosage ;
- S'abstenir aux instructions avec le kit pendant d'effectuer le dosage ;
- Respecter la date de péremption du kit ;
- Utiliser seulement les réactifs présents dans le kit et ceux conseillés par le producteur ;
- Ne pas échanger les réactifs provenant de lots différents. Ne pas utiliser des réactifs provenant de kits d'autres producteurs.

Avertissement et précautions spécifiques pour les réactifs:

Les réactifs du kit **SMART SNP FVL Direct Kit** présentent les Conseils de Prudence suivant (P) : **P261** : Éviter de respirer les poussières / fumées / gaz / brouillards / vapeurs / aérosols ; **P262** Eviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements.

Conservation :

Conserver le composant **SMART SNP Sample Diluent** à une température comprise entre -25°C et -15°C dans un congélateur jusqu'à la première utilisation. Une fois le produit décongelé, le conserver à +4°C, pour un maximum de 5 utilisations successives.

Conserver le composant **SMART SNP FVL Master Mix** à une température comprise entre -25°C et -15°C dans un congélateur jusqu'à la première utilisation. Une fois que le mélange a été décongelé, il est possible de le recongeler et exécuter au maximum 3 cycles de congélation / décongélation.

Réduire au minimum l'exposition à la lumière des composants du kit.

Conserver tous les composants du kit dans les emballages d'origine.

Mélanger délicatement et centrifuger les éprouvettes avant ouverture.

Ces conditions de conservation s'appliquent aux composants ouverts et à ceux qui ne sont pas encore ouverts.

Les composants conservés dans des conditions différentes de celles spécifiées sur l'étiquette pourraient ne pas fournir des prestations correctes, et agir négativement sur les résultats de l'essai.

Stabilité du kit :

Les dates de péremption pour chaque réactif sont reportées sur les étiquettes des composants. Le kit conserve ses prestations inaltérées jusqu'à la date de péremption reportée sur l'étiquette dans des conditions de conservation correctes.

ECHANTILLONS ET CONTROLES

Nature des échantillons :

Le produit **SMART SNP FVL Direct Kit (SNPD-030)** peut être utilisé pour l'analyse de :

- **Sang périphérique** recueilli en éprouvette avec EDTA, Héparine ou citrate de sodium ;
- **ADN génomique** extrait d'échantillons de sang périphérique recueilli en éprouvette avec EDTA, Héparine ou citrate de sodium.

Sang périphérique :

Les échantillons de sang périphérique prélevé en EDTA ou en citrate de sodium ou héparine doivent être prélevés selon les lignes directrices du laboratoire et transportés et conservés à une température comprise entre +4° et +6°C, pendant un maximum de 7 jours avant l'analyse. Alternativement, les échantillons peuvent être congelés et conservés à une température comprise entre -25°C et -15°C. Il est conseillé de diviser les échantillons en aliquots avant la congélation, de façon à éviter des cycles de congélation/décongélation.

Nota Bene : Le prélèvement de sang doit être effectué en suivant une procédure approuvée. Il est important que l'échantillon ne soit pas coagulé.

Pour chaque échantillon de sang périphérique, le test prévoit :

La dilution de l'échantillon 1:18 avec **SMART SNP Sample Diluent**. Il est conseillé d'effectuer la dilution dans un volume final de 90 µL.

Dilution pré-réaction	Code couleur éprouvette	Volume pour 1 échantillon (µl)
Sample diluent	BLANC	85
Echantillon de sang	/	5
	Volume total	90

Dans le cas d'une utilisation d'un **distributeur automatique** il est conseillé d'utiliser le produit **SMART SNP Sample Diluent (Code SNPD-SD)**. Dans ce cas la dilution sera effectuée dans un volume final de 1,98 ml.

Nota Bene :

Pour une bonne réussite du test, l'échantillon de sang périphérique (frais ou congelé) doit être homogène (pas de phases de séparation). Pendant les phases de dilution et de préparation de la plaque d'analyse **NE PAS CENTRIFUGER les échantillons de sang**.

Il est conseillé de retourner 2/3 fois l'éprouvette originale avant de prélever la quantité de sang nécessaire, de façon à créer une phase unique et uniforme.

Une fois l'échantillon de sang périphérique ajouté au Sample Diluent, s'assurer que le mélange soit homogène. En cas de formation de phases, pipetter jusqu'à leur complète dissolution.

Trois µl de la dilution de pré-réaction ainsi préparée seront amplifiés avec le mélange **SMART SNP FVL Master Mix**, comme illustré à la page 8 de ce manuel.

ADN génomique :

L'ADN génomique doit être extrait d'échantillons de sang périphérique, recueilli en éprouvettes avec EDTA, Héparine ou citrate de sodium. Pour l'extraction de l'ADN il est conseillé d'utiliser le kit *QIAamp ADN Blood Mini Kit (Qiagen)* ou *NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel)*. La préparation de l'ADN doit être effectuée en suivant la procédure indiquée dans le manuel d'instructions des produits indiqués. La qualité du résultat obtenu avec le produit **SMART SNP FVL Direct Kit (SNPD-030)** dépend largement de la qualité de l'ADN génomique utilisé.

Il est rappelé que les échantillons d'ADN Génomique ne peuvent être testés uniquement sur l'appareil AriaDx – Agilent.

Pour chaque réaction, un volume d'ADN de 3 µl est utilisé. Ce volume doit contenir une quantité d'ADN génomique comprise entre **1 ng et 5 ng**.

Diluer chaque ADN à analyser à une concentration comprise entre 0,33 ng/µl (correspondant à 1 ng d'ADN total en réaction) et 1,67 ng/µl (correspondant à 5 ng d'ADN total en réaction). Il est conseillé de préparer plusieurs aliquots des échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à des cycles de congélation/décongélation répétés.

Substances interférentes :

Les échantillons d'ADN extrait ne doivent pas contenir d'héparine et/ou d'hémoglobine pour éviter les phénomènes d'inhibition et donner lieu à des résultats non valides.

Les effets de substances comme les antibiotiques, les médicaments antiviraux, les médicaments utilisés en chimiothérapie ou les médicaments immunosuppresseurs sur l'inhibition ne sont pas disponibles.

Contrôles d'amplification :

Il est conseillé de valider chaque session d'amplification avec une réaction de contrôle négatif et une réaction de contrôle positif. Pour le contrôle négatif, utiliser de l'eau bi-distillée stérile (en dotation avec le produit, **Eau Ultrapure**, éprouvette avec le bouchon TRANSPARENT). Pour le contrôle positif, utiliser le produit accessoire Bioclarma **SMART SNP Coagulation Factors POSITIVE CONTROL** (éprouvette avec le bouchon ROUGE).

PROCEDURE

Avant de commencer la session il est nécessaire de :

- Diluer les échantillons de sang avec le **SMART SNP Sample Diluent** et/ou porter à concentration les échantillons d'ADN génomique en suivant la description du paragraphe "Échantillons et Contrôles" ;
- Vérifier, en suivant la documentation de l'appareil, que le thermocycleur pour PCR en temps réel soit capable d'exciter les fluorochromes des canaux indiqués dans le paragraphe "Caractéristiques du kit" et d'en mesurer l'émission ;
- Indiquer, en suivant la documentation de l'appareil, la position dans la microplaque des réactions, le type de fluorescence à mesurer et le type de réaction (échantillon, contrôle négatif d'amplification, standard de quantité connue). Remplir le **Plan de travail** fourni avec cette fiche technique en transcrivant ces informations. Le **Plan de travail** devra être suivi avec attention pendant le transfert du mélange réactionnel et des échantillons dans les micropuits.

Un exemple d'organisation pour l'analyse de 22 échantillons est disponible ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C9	C17									
B	C2	C10	C18									
C	C3	C11	C19									
D	C4	C12	C20									
E	C5	C13	C21									
F	C6	C14	C22									
G	C7	C15	PC									
H	C8	C16	NC									

PC : Contrôle Positif; NC: Contrôle Négatif; C1-C22: échantillons.

Programmation de l'appareil : protocole thermique et acquisition de la fluorescence

Indiquer, en suivant la documentation de l'appareil, les paramètres du cycle thermique, en indiquant **40 cycles** et un volume de réaction de **12 µl**.

Le produit **SMART SNP FVL Direct Kit** est validé sur les appareils :

- CFX-96 de BioRad et CFX Connect de BioRad ;
- AriaDx PCR en temp réel System de Agilent.

Cycle thermique pour l'appareil CFX-96 et CFX Connect-BioRad

Programme RT-PCR		
Température	Temps	Phase
94°C	8 min	Dénaturation
94°C	40 s	40 cycles
60°C (*)	1 min	

(*) Lecture de la fluorescence

Les fluorochromes qui doivent être révélés doivent avoir une valeur de fluorescence correspondante aux canaux suivants :

- **Canal FAM:** pour la révélation de l'allèle *wild type* du Facteur V.
- **Canal HEX :** pour la révélation de l'allèle *muté* du Facteur V, (G1691A LEIDEN).

Régler les canaux adéquats en se référant à la documentation de l'appareil.

Modalité pour l'analyse :

Choisir l'option single threshold et sélectionner l'option "baseline subtracted curve fit".

Pour les échantillons de sang périphérique et les contrôles : fixer la Valeur Seuil (Valeur de Threshold) à **60**, pour tous les canaux de fluorescence.

Réglez "Appliquer la correction de la dérive de fluorescence (*Drift Correction*)".

Attribuer aux diagrammes d'amplification les codes couleurs suivants (NB : cette étape n'est pas nécessaire si l'on utilise un système automatique pour la préparation de la microplaque et l'analyse des résultats).

	Canal de fluorescence	Cible	Couleur trace
	FAM	Sonde WT Facteur V	BLEU
	HEX	Sonde MUT Facteur V	VERTE

Cycle thermique pour l'appareil AriaDx PCR en temps réel System- Agilent :

Programme RT-PCR syr AriaDX - Agilent		
Température	Temps	Phase
94°C	8 min	Dénaturation
94°C	40 s	40 cycles
60°C (*)	1 min	

(*) Lecture de la fluorescence

Les fluorochromes qui doivent être révélés, doivent avoir une valeur de fluorescence correspondante aux canaux suivants :

- **Canal FAM** : pour la révélation de l'allèle *wild type* du Facteur V.
- **Canal HEX** : pour la révélation de l'allèle *muté* du Facteur V, (G1691A LEIDEN).

Régler les canaux adéquats en se référant à la documentation de l'appareil.

Modalité de l'analyse :

Fluorescence Term : ΔR ;

Smoothing : On ;

Baseline Correction : Entre les cycles 6 et 25 ;

Crosstalk Correction : Sous l'option "HEX-JOE" près de l'indicateur FAM* entrer la valeur 20.

Pour les échantillons de sang périphérique d'ADN et les contrôles : fixer la Valeur Seuil (Valeur de Threshold Fluorescence) à **60**, pour tous les fluorochromes.

Attribuer aux diagrammes d'amplification les codes couleurs suivants (NB : cette étape n'est pas nécessaire si l'on utilise un système automatique pour la préparation de la microplaque et l'analyse des résultats).

	Canal de fluorescence	Cible	Couleur trace
■	FAM	Sonde WT Facteur V	BLEU
■	HEX	Sonde MUT Facteur V	VERTE

Mise en place de l'amplification :

Avant de commencer la session il est nécessaire de :

- Pour les échantillons de sang périphérique : prélever et/ou décongeler les éprouvettes avec les échantillons à analyser en les gardant sur glace. **NE PAS centrifuger** les échantillons mais retourner les éprouvettes 2/3 fois avant de procéder à la dilution 1:18 avec le Sample Diluent (créer une phase unique et uniforme). Une fois l'échantillon de sang périphérique ajouté au Sample Diluent, s'assurer que le mélange soit homogène. En cas de formation de phases, pipetter jusqu'à leur complète dissolution.
 - Pour les échantillons d'ADN génomique à analyser uniquement avec l'appareil AriaDx – Agilent : prélever et/ou décongeler les éprouvettes avec les échantillons à analyser en les gardant sur glace. Mélanger et centrifuger les éprouvettes pendant 5 secondes pour reporter le contenu sur le fond et les garder sur glace jusqu'au moment de leur utilisation.
 - Prélever et garder sur glace les éprouvettes de **SMART SNP FVL Master Mix (Bouchon VERT)** nécessaire à l'analyse. Chaque éprouvette de **SMART SNP FVL Master Mix** contient un volume de mélange suffisant pour 24 réactions d'amplification. **Avec un tube, il est possible d'analyser 22 échantillons cliniques en simple, un contrôle d'amplification positif et un contrôle d'amplification négatif.** Mélanger la solution **SMART SNP FVL Master Mix** pendant 5 secondes à l'aide d'un vortex à basse vitesse, éviter la formation de bulles. Centrifuger brièvement les éprouvettes pour reporter le contenu sur le fond et les garder sur glace jusqu'au moment de leur utilisation.
 - Prélever et décongeler l'éprouvette de **Coagulation Factors POSITIVE CONTROL (Bouchon ROUGE)**. Mélanger la solution plasmidique pendant 5 secondes à l'aide d'un vortex à basse vitesse, éviter la formation de bulles. Centrifuger brièvement les éprouvettes pour reporter le contenu sur le fond et les garder sur glace jusqu'au moment de leur utilisation.
 - Prélever et garder sur glace les éprouvettes de **SMART SNP Sample Diluent (Bouchon BLANC)** nécessaire à l'analyse. Mélanger la solution pendant 5 secondes à l'aide d'un vortex à basse vitesse, éviter la formation de bulles. Centrifuger brièvement les éprouvettes pour reporter le contenu sur le fond et les garder sur glace jusqu'au moment de leur utilisation.
 - Prélever et garder sur glace l'éprouvette **SMART SNP Ultrapure Water (Bouchon TRANSPARENT)**. Centrifuger brièvement les éprouvettes pour reporter le contenu sur le fond et les garder sur glace jusqu'au moment de leur utilisation.
- 1) Diluer les échantillons de sang entier avec le **SMART SNP Sample Diluent (Bouchon BLANC)** en suivant les indications de la section "Échantillons et Contrôles" ;
 - 2) Diluer les échantillons d'ADN génomique en suivant les indications de la section "Échantillons et Contrôles" ;

- 3) Transférer, en les déposant soigneusement sur le fond des puits de la microplaque de réaction, **9 µl** du **SMART SNP FVL Master Mix**, en suivant l'ordre établi sur le Plan de travail ;
- 4) Transférer, en les déposant soigneusement sur le fond, **3 µl** de **SMART SNP Ultrapure Water (Bouchon TRANSPARENT)** dans le puits correspondant au contrôle négatif d'amplification, en suivant l'ordre établi sur le Plan de travail ;
- 5) Transférer, en les déposant soigneusement sur le fond, **3 µl** du premier **échantillon clinique** (sang dilué avec le Sample Diluent et/ou ADN génomique) dans le puits correspondant de la microplaque. Procéder de la même façon avec tous les autres échantillons, en suivant le Plan de travail ;
- 6) Transférer, en les déposant soigneusement sur le fond, **3 µl** de **SMART SNP Coagulation Factors POSITIVE CONTROL**, dans le puits correspondant le contrôle positif d'amplification, en suivant le Plan de travail ;
- 7) Sceller soigneusement la microplaque avec la feuille adhésive et centrifuger rapidement ;
- 8) Transférer la microplaque dans le thermocycleur pour PCR en temp réel et lancer le cycle thermique d'amplification.

Acquisition et interprétation des résultats :

Les **Valeurs de Fluorescence** émises par les sondes spécifiques pour l'allèle Wild Type et pour l'allèle Homozygote Muté de chaque polymorphisme, avec la **Valeur Seuil (Valeur de Threshold)** de fluorescence sont utilisées par l'appareil pour révéler la présence d'ADN cible par la détermination du **Cycle Seuil (Threshold Cycle)**, soit le cycle auquel la Valeur Seuil de fluorescence est atteinte.

NB : Vérifier avec le programme de l'appareil utilisé que la valeur de Ct enregistré corresponde à une augmentation rapide et régulière de la valeur de fluorescence et ne dérive pas de pics isolés ou d'une augmentation du bruit de fond.

- ③ **Validation générale de l'amplification et de la révélation :**

CONTRÔLE NEGATIF

Les valeurs de fluorescence émise par les sondes spécifiques pour le Facteur V (Wild Type et Muté) dans les réactions d'amplification du **Contrôle Négatif**

de réaction et la Valeur **Seuil (Threshold)** de fluorescence établie pour la session d'amplification sont utilisées pour valider l'amplification et la révélation, en suivant le tableau suivant :

Cycle seuil pour le CONTROLE NEGATIF			Intervalle d'acceptabilité	Amplification / Révélation
FACTEUR V	Wild type (FAM)	Non déterminé	NEGATIF	CORRECTE
	Muté (HEX)			

Si le résultat de la réaction d'amplification du Contrôle négatif est différent de "Non Déterminé", c'est-à-dire si la présence d'ADN cible a été relevée dans la réaction d'amplification (détermination d'un Cycle seuil – Ct – auquel la valeur seuil de fluorescence a été atteinte), des problèmes ont été rencontrés pendant la phase d'amplification (contamination) qui peuvent causer des résultats erronés et des faux positifs.

Le dosage n'est pas valide et doit être répété. Consulter le "Guide pour la résolution des problèmes" à la fin du document pour trouver une solution.

CONTRÔLE POSITIF

Les valeurs de fluorescence émise par les sondes spécifiques pour le Facteur V (Wild Type et Muté) dans les réactions d'amplification du **Contrôle Positif** de réaction sont utilisées pour valider l'amplification et la révélation, en suivant le tableau suivant :

Cycle seuil pour le CONTROLE POSITIF			Résultat du test	Amplification / Révélation
FACTEUR V	Wild type (FAM)	Ct ≤ 32	VALIDE	CORRECTE
	Muté (HEX)	Ct ≤ 32		





Si le résultat de la réaction d'amplification du **Contrôle Positif** n'est pas compris dans les limites indiquées ci-dessus, des problèmes pourraient être vérifiés pendant les phases d'amplification et/ou révélation, qui peuvent causer des résultats faux négatifs.

Le dosage n'est pas valide et doit être répété. Consulter le "Guide pour la résolution des problèmes" à la fin du document pour trouver une solution.

- ③ **Recherche de la Mutation du Facteur V (G1691A LEIDEN) :**

Les valeurs de fluorescence émise par les sondes spécifiques pour le Facteur V (Wild Type et Muté) dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon**

(ADN génomique et/ou sang entier dilué) sont utilisées pour définir les mutations de l'échantillon en examen, en suivant le tableau suivant :

	RESULTAT ECHANTILLON		Qualité de l'échantillon	GENOTYPE
	Cycle Seuil	Trace		
FACTEUR V	Ct canal FAM ≤ 38 Ct canal HEX > 38 / Non déterminé		ADAPTEE	HOMOZYGOTE WILD TYPE
	Ct canal FAM > 38 / Non déterminé Ct canal HEX ≤ 38		ADAPTEE	HOMOZYGOTE MUTE
	Ct canal FAM > 38 / Non déterminé Ct canal HEX > 38 / Non déterminé		NON ADAPTEE	NON DETERMINE
	Ct canal FAM ≤ 38 Ct canal HEX ≤ 38		ADAPTEE	HETEROZYGOTE

Nota Bene : Les résultats obtenus doivent être analysés en considérant le cycle seuil spécifique de chaque sonde. Sur le diagramme des courbes d'amplification, chaque fluorochrome sera caractérisé par un code couleur propre, comme décrit à la page 6 et dans le tableau précédent.

Si le résultat de la réaction d'amplification pour un échantillon est "Ct > 38" pour l'allèle Wild Type du Facteur V et "Ct > 38" pour l'allèle muté du Facteur V, des problèmes ont été rencontrés pendant la phase de préparation des échantillons (dilution erronée/mauvaise manipulation des échantillons de sang entier, problèmes pendant l'extraction d'ADN génomique), ou pendant la phase d'amplification (amplification inefficace ou nulle), qui peuvent causer des résultats erronés.

Dans ce cas le dosage n'est pas valide et doit être répété. Consulter le "Guide pour la résolution des problèmes" à la fin du document pour trouver une solution.

Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en considérant toutes les données cliniques et les autres examens de laboratoire réalisés sur le patient.

LIMITATIONS A LA PROCEDURE

Avec ce produit :

- Utiliser des échantillons de sang périphérique recueilli en EDTA, Sodium Citrate ou Héparine.
- Utiliser des échantillons de sang périphérique frais ou conservés à 4°C pendant une période maximale de 7 jours. En cas de nécessité, utiliser des échantillons de sang entier congelés à une température comprise entre -15°C et -25°C.
- Utiliser de l'ADN extrait d'échantillons de sang périphérique recueilli en EDTA, citrate de sodium ou Héparine.
- N'utilisez pas de quantités d'ADN génomique en dehors de la plage recommandée dans le test.
- Ne pas utiliser d'ADN génomique contaminé par des résidus d'hémoglobine qui inhibe la réaction d'amplification, donnant ainsi origine à des résultats non valides.

Les effets de substances comme les antibiotiques, les médicaments antiviraux, les médicaments utilisés en chimiothérapie ou les médicaments immunosuppresseurs sur l'inhibition ne sont pas disponibles.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent des procédures de prélèvement, de transport, de conservation et de préparation des échantillons. Afin d'éviter des résultats erronés il est nécessaire de porter une attention particulière durant ces phases pré-analytiques en respectant les instructions pour la manipulation des échantillons décrites dans ce manuel.

Du fait de sa grande sensibilité analytique, le protocole d'amplification des acides nucléiques, sur lequel ce produit est basé, est sujet à contamination par des échantillons cliniques, des contrôles positifs et des produits d'amplification. Les phénomènes de contamination produisent des résultats faux-positifs. Ce phénomène peut être évité en suivant les bonnes pratiques de laboratoire et en respectant scrupuleusement les instructions fournies dans ce manuel.

Ce produit nécessite :

- L'utilisation de personnel expert dans la manipulation d'échantillons biologiques potentiellement infectés et des substances chimiques et des préparations classées comme dangereuses, dans le but de prévenir des accidents ayant des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et d'autres personnes.

- L'utilisation de vêtements de travail et de locaux adaptés à la manipulation d'échantillons biologiques potentiellement infectés et des substances chimiques et des préparations classées comme dangereuses, dans le but de prévenir des accidents ayant des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et d'autres personnes.
- L'utilisation de personnel formé aux techniques de biologie moléculaire, telles que l'extraction, l'amplification et la révélation des acides nucléiques afin d'éviter des résultats erronés.
- La présence de zones séparées pour les phases d'extraction/préparation des réactions d'amplification et d'amplification/révocation des produits d'amplification, afin d'éviter des résultats erronés.
- L'utilisation d'appareils et de vêtements de travail réservés pour les phases d'extraction/préparation des réactions d'amplification et d'amplification/révocation des produits d'amplification, afin d'éviter des résultats faux-positifs.

Comme pour chaque dispositif diagnostic :

- Les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et de laboratoire du patient.
- Il existe un risque résiduel d'obtenir des résultats non valides, des faux-positifs ou des faux-négatifs. Ce risque résiduel ne peut être éliminé ou réduit ultérieurement. Dans des situations particulières, telles que le diagnostic d'urgence, ce risque résiduel peut contribuer à la prise de décisions erronées avec des conséquences potentiellement graves pour le patient.

GUIDE POUR LA RESOLUTION DES PROBLEMES

Fréquence élevée de résultats non valides ou non déterminés dans les réactions des échantillons	
Causes probables	Solutions
<ul style="list-style-type: none"> ADN extrait contaminé par de l'hémoglobine 	<ul style="list-style-type: none"> Toujours contrôler la qualité de l'ADN et la concentration avant de commencer
<ul style="list-style-type: none"> Dilution erronée du sang entier 	<ul style="list-style-type: none"> Toujours contrôler que la dilution du sang entier soit correctement effectuée avant de commencer
<ul style="list-style-type: none"> Excès de matériel (ADN ou sang entier) dans la réaction 	<ul style="list-style-type: none"> Ne pas utiliser plus de 5 ng d'ADN dans la réaction et un volume de sang dilué de 3 µl
<ul style="list-style-type: none"> Problème de système optique 	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier le schéma de pipetage et la configuration de la réaction (température)
Signal négatif pour le Contrôle Positif	
Causes probables	Solutions
<ul style="list-style-type: none"> Erreur de pipetage 	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier le schéma de pipetage et la configuration de la PCR Répéter la séquence PCR
<ul style="list-style-type: none"> Conservation inadéquate des composants du kit Contrôle positif dégradé 	<ul style="list-style-type: none"> Aliquoter les réactifs Conserver le kit SMART SNP Direct Kit à une température comprise entre -15°C et -25°C à l'abri de la lumière Eviter de congeler et décongeler plus de 3 fois Utiliser un nouvel aliquot de SMART SNP POSITIVE CONTROL
Le contrôle Négatif (Eau) est positif	
Causes probables	Solutions
<ul style="list-style-type: none"> Contamination croisée 	<ul style="list-style-type: none"> Remplacer tous les réactifs intéressés Répéter le test avec des nouveaux aliquots de tous les réactifs Manipuler les échantillons, les composants du kit et les accessoires selon les bonnes pratiques de laboratoire pour éviter les phénomènes de transfert. Nettoyer les surfaces de travail et les appareils avec des détergents appropriés, laver les blouses de laboratoire
<ul style="list-style-type: none"> La microplaque n'est pas bien scellée 	<ul style="list-style-type: none"> Faire particulièrement attention à sceller la microplaque avec la feuille adhésive
<ul style="list-style-type: none"> Dégradation de la sonde 	<ul style="list-style-type: none"> Conserver le kit SMART SNP Direct Kit à une température comprise entre -15°C et -25°C à l'abri de la lumière

Absence de signal, également dans le Contrôle Positif	
Causes probables	Solutions
<ul style="list-style-type: none"> • Canal de révélation erroné 	<ul style="list-style-type: none"> • Régler correctement l'appareil
<ul style="list-style-type: none"> • Erreur de pipetage ou réactifs oubliés 	<ul style="list-style-type: none"> • Vérifier le schéma de pipetage et la configuration de la réaction
<ul style="list-style-type: none"> • Dégradation de la sonde 	<ul style="list-style-type: none"> • Utiliser un nouvel aliquot de SMART SNP Master Mix
<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle positif dégradé 	<ul style="list-style-type: none"> • Utiliser un nouvel aliquot de SMART SNP POSITIVE CONTROL
<ul style="list-style-type: none"> • Dilution erronée du sang entier 	<ul style="list-style-type: none"> • Toujours contrôler que la dilution du sang entier soit correctement avant de commencer
<ul style="list-style-type: none"> • Effet inhibiteur de l'échantillon 	<ul style="list-style-type: none"> • Répéter la purification de l'ADN
Signal absent ou bas dans les échantillons et correct pour le Contrôle Positif	
Causes probables	Solutions
<ul style="list-style-type: none"> • Qualité ou concentration de l'ADN • Dilution erronée du sang entier 	<ul style="list-style-type: none"> • Toujours contrôler la qualité de l'ADN avant de commencer • Toujours contrôler que la dilution du sang entier soit correctement effectuée avant de commencer
Intensité de fluorescence trop basse	
Causes probables	Solutions
<ul style="list-style-type: none"> • Conservation inadéquate des composants du kit 	<ul style="list-style-type: none"> • Aliquoter les réactifs • Conserver le kit SMART SNP Direct Kit à une température comprise entre -15°C et -25°C à l'abri de la lumière • Eviter de congeler et décongeler plusieurs fois
<ul style="list-style-type: none"> • Quantité initiale de matériel (sang entier dilué ou ADN) trop basse 	<ul style="list-style-type: none"> • Toujours contrôler la quantité de matériel avant de commencer

BIBLIOGRAPHIE

Johnson NV et al. (2012) *Am J Hematology* 87: 108-112
Berg AO et al (2011) *Genet Med* 13(1): 67 – 76
Emadi A et al. (2010) *Am J Hematology* 85 (4): 264-270
Poort S.R. et al. (1996) *Blood* 88: 3698 – 3703
Voorberg J. et al. (1994) *The Lancet* 343: 1535 – 1536
Baker R. et al. (1994) *The Lancet* 344: 1162



Numéro de catalogue



Limites de températures



Code du lot



Utiliser avant



Conforme à la directive 98\79\CE



Dispositif médical diagnostique in vitro



Contenu suffisant pour "N" tests



Consulter le mode d'emploi



Fabricant

PLAN DE TRAVAIL (SCHEMA)

Date :

Opérateur :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												