

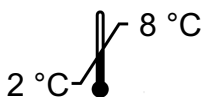
α -Globin StripAssay[®]

Notice d'utilisation

REF



4-160	10 tests
4-160-A	24 tests
4-160-TRIAL	5 tests



IVD



Version : rév. 1.3 / Français
Notice d'utilisation électronique et autres
langues disponibles sur www.viennalab.com

CE 0123



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45, A-1120 Vienna, Austria

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com

TABLE DES MATIÈRES

I.	USAGE PRÉVU	4
II.	RAPPELS	4
III.	MÉTHODOLOGIE	4
IV.	CONTENU DE LA TROUSSE	6
V.	MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	7
VI.	PROCÉDURE DE TEST	8
VII.	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	12
VIII.	ÉVALUATION DES PERFORMANCES	14
IX.	SUBSTANCES INTERFÉRENTES	14
X.	LIMITES DU TEST	15
XI.	CONSIDÉRATIONS RELATIVES À LA QUALITÉ	15
XII.	SÉCURITÉ	15
XIII.	ASSISTANCE TECHNIQUE	16
XIV.	RÉFÉRENCES	16
XV.	SIGNALEMENT AU FABRICANT	16
XVI.	SYMBOLES	17
XVII.	EXEMPLES DE RÉSULTATS DE TEST	18
XVIII.	PRODUITS CONNEXES	20

HISTORIQUE DES RÉVISIONS :

version	date	description
Rév. 1.1	2022-02	Marquage CE avec numéro d'identification de l'organisme notifié ; lien vers le résumé des caractéristiques de sécurité et des performances (SSP, Summary of Safety and Performance) ; déclaration relative à l'origine de l'échantillon et à l'utilisation manuelle/semi-automatique (I) ; spécification des composants de la trousse (IV) ; données sur les performances cliniques (VIII)
Rév. 1.2	2022-05	Date de publication, référence à la version électronique du mode d'emploi (eIFU), Iran (II) inclus.
Rév. 1.3	2022-11	Amélioration de la présentation et de la résolution des figures

Le résumé des caractéristiques de sécurité et des performances (SSP, Summary of Safety and Performance) du StripAssay® est disponible dans la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (EUDAMED, European Database on Medical Devices) à l'adresse <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> ou auprès du fabricant.

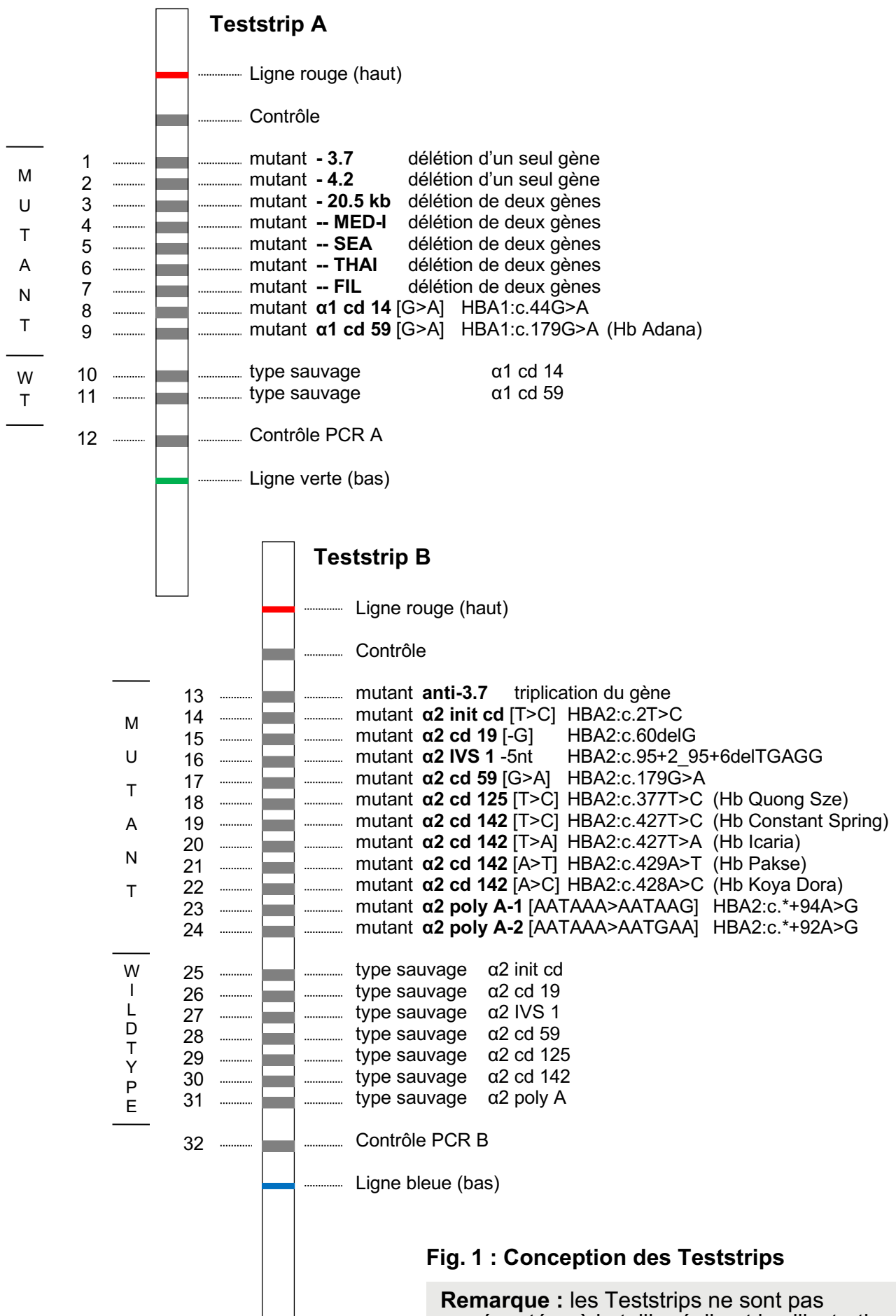


Fig. 1 : Conception des Teststrips

Remarque : les Teststrips ne sont pas représentés à la taille réelle et les illustrations ne doivent pas être utilisées à des fins d'interprétation des résultats !

I. USAGE PRÉVU

Le test α-Globin StripAssay® est un test génétique qualitatif pour l'analyse ciblée de 21 grandes délétions et mutations ponctuelles fréquentes des gènes des *sous-unités alpha 1 (HBA1, hemoglobin subunit alpha 1)* et *alpha 2 (HBA2, hemoglobin subunit alpha 2)* de l'hémoglobine dans l'ADN isolé du sang périphérique humain. Ce test est utilisé pour confirmer un diagnostic présumé d'alpha-thalassémie (α thal) par analyse génétique. Le test peut également être utilisé pour déterminer le statut de porteur chez les parents d'un patient atteint de thalassémie et au sein de la population générale. Le test StripAssay® peut être effectué manuellement ou de manière semi-automatisée.

Pour usage diagnostique humain *in vitro*.

II. RAPPELS

Les mutations des gènes de l'*α-globine* sont la cause génétique de l'alpha-thalassémie, maladie héréditaire à transmission autosomique récessive, qui se caractérise par une absence totale ou une production insuffisante de la chaîne α de la globine. Le tableau clinique varie en fonction du nombre d'allèles affectés.

Il est recommandé de procéder à un test de dépistage chez les patients présentant des valeurs hématologiques caractéristiques d'une anémie microcytaire et un profil hémoglobinique concordant, chez les membres de la famille d'un patient atteint, chez les futurs parents, ainsi que chez les individus issus de populations à haut risque (région méditerranéenne, Afrique, péninsule arabique, Iran, Inde et Asie du Sud-Est, par exemple) susceptibles d'être porteurs d'une alpha-thalassémie.

III. MÉTHODOLOGIE

Le test α-Globin StripAssay® est basé sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR, polymerase chain reaction) et l'hybridation inverse. La procédure de test comporte trois étapes : 1) isolement de l'ADN, 2) amplification par PCR à l'aide d'amorces biotinylées, et 3) hybridation des produits d'amplification sur une teststrip contenant des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'un allèle, qui sont immobilisées en lignes parallèles (Fig. 1). Les séquences biotinylées liées sont détectées en utilisant la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline et des substrats colorimétriques.

Le test α-Globin StripAssay® détecte les mutations suivantes dans le locus du gène de l'α globine :

désignation	nomenclature de la HGVS	RefSNP
1 -3.7 kb	NG_000006.1:g.34164_37967del3804	--
2 -4.2 kb	s.o.	--
3 --20.5 kb	NG_000006.1:g.15164_37864del22701	--
4 --MED-I	NG_000006.1:g.24664_41064del16401	--
5 --SEA	NG_000006.1:g.26264_45564del19301	--
6 --THAI	NG_000006.1:g.10664_44164del33501	--
7 --FIL	NG_000006.1:g.11684_43534del31851	--
8 tripllication du gène anti-3.7	s.o.	--
9 cd 14 [G>A]	HBA1:c.44G>A	rs63750090
10 cd 59 [G>A] Hb Adana	HBA1:c.179G>A	rs28928878
11 initiation cd [T>C]	HBA2:c.2T>C	rs111033603
12 cd 19 [-G]	HBA2:c.60delG	rs886041399
13 IVS1-5nt	HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG	rs41474145
14 cd 59 [G>A]	HBA2:c.179G>A	rs281864846
15 cd 125 [T>C] Hb Quong Sze	HBA2:c.377T>C	rs41397847
16 cd 142 [T>C] Hb Constant Spring	HBA2:c.427T>C	rs41464951
17 cd 142 [T>A] Hb Icaria	HBA2:c.427T>A	rs41464951
18 cd 142 [A>T] Hb Pakse	HBA2:c.429A>T	rs41412046
19 cd 142 [A>C] Hb Koya Dora	HBA2:c.428A>C	rs41321345
20 polyA-1 [AATAAA>AATAAG]	HBA2:c.*+94A>G	rs63751269
21 polyA-2 [AATAAA>AATGAA]	HBA2:c.*+92A>G	rs63750067

Séquence de référence (RefSeq, Reference Sequence) :

NG_000006.1



NM_000558.3 (HBA1)

NM_000517.4 (HBA2)

Le test peut être effectué manuellement ou de manière semi-automatisée en utilisant des instruments conçus pour le traitement automatisé des teststrips (voir rubrique VI. 3.4).

IV. CONTENU DE LA TROUSSE

REF

	4-160	4-160-A	4-160 -TRIAL
1a. Amplification Mix A1 (<i>bouchon jaune</i>)	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1b. Amplification Mix A2 (<i>bouchon blanc</i>)	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1c. Amplification Mix B (<i>bouchon vert</i>)	250 µl	2x 250 µl	250 µl
2. Taq Dilution Buffer (<i>bouchon transparent</i>)	500 µl	500 µl	500 µl
3. HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (<i>bouchon rouge</i>)	125 U	175 U	125 U
4. DNAT (<i>bouchon bleu</i>)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
 Avertissement : le DNAT contient 1,6 % de NaOH. H315 : Provoque une irritation cutanée. H319 : Provoque une sévère irritation des yeux. P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P337 + P313 : Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.			
5. Typing Trays	3	---	2
6a. Teststrips A (<i>bouchon noir</i>)	10	24	5
6b. Teststrips B (<i>bouchon blanc</i>)	10	24	5
7. Hybridization Buffer (<i>bouchon blanc</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
8. Wash Solution A (<i>bouchon blanc</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
9. Conjugate Solution (<i>bouchon transparent</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
10. Wash Solution B (<i>bouchon transparent</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
11. Color Developer (<i>bouchon marron</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
 Avertissement : le Color Developer contient ≤ 0,4 % d'acide maléique. H317 : Peut provoquer une allergie cutanée. P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P302 + P352 : En cas de contact avec la peau : laver abondamment à l'eau et au savon. P333 + P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.			
12. Notice d'utilisation	1	1	1
13. Collector™ Sheet	1	3	1

Remarque : conserver tous les réactifs à une température comprise entre 2 et 8 °C lorsqu'ils ne sont pas utilisés !

nom du composant	composition
Amplification Mix A1/A2/B	oligonucléotides marqués à la biotine en 5', un mélange équimolaire de désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), MgCl ₂ , tampon de sulfate d'ammonium, bétaïne, azoture de sodium à 0,05 %
Taq Dilution Buffer	tampon pour HS-Taq DNA Polymerase, contenant KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ et MgCl ₂ , azoture de sodium à 0,05 %
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	Taq ADN polymérase Hot Start à une concentration de 5 U/µl
DNAT	solution basique contenant de l'hydroxyde de sodium à 1,6 % et un colorant bleu indiquant une modification du pH
Typing Trays	plaque de huit puits en plastique

nom du composant	composition
Teststrips A/B	sondes oligonucléotidiques spécifiques d'un allèle, contrôle de la réaction PCR positive et contrôle d'hybridation, immobilisés en lignes parallèles sur une membrane renforcée en polyester délimitée par une ligne rouge en haut et une ligne verte (Teststrip A) ou bleue (Teststrip B) en bas
Hybridization Buffer	tampon de phosphate contenant < 2 % de détergent
Wash Solution A	tampon de citrate contenant < 1 % de détergent
Conjugate Solution	streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline, diluée dans un tampon à base saline contenant 0,05 % d'azoture de sodium
Wash Solution B	tampon tris contenant < 2 % de détergent et 0,05 % d'azoture de sodium
Color Developer	substrat colorimétrique pour la phosphatase alcaline contenant du bleu de nitrotétrazolium (NBT, nitro blue tetrazolium) et du phosphate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
Notice d'utilisation	imprimé sur papier
Collector™ Sheet	imprimé sur papier

V. MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

Outre l'équipement standard du laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est nécessaire :

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- Thermocycleur muni d'un toit chauffant (pour les vitesses de montée en température, voir rubrique VIII)
- Bain-marie avec plateau d'agitation, couvercle et réglage de la température ($45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$)
- Agitateur (linéaire ou orbital)

Facultatif :

- Appareil d'aspiration
- Agitateur thermique pour plaque de microtitrage avec couvercle et réglage de la température ($45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), p. ex. PST-60 HL (Biosan) ou dispositif équivalent
- Instrument pour l'hybridation automatisée, température et durée programmables, comme décrit à la rubrique VI. 3.4, p. ex. DYNABLOT Heat (Dynex) ou dispositif équivalent
- Équipement d'électrophorèse sur gel d'agarose (pour le contrôle des produits d'amplification)

VI. PROCÉDURE DE TEST

1. Préparation des échantillons

Échantillon : Utiliser du sang frais ou congelé sur anticoagulant EDTA. Le sang hépariné ou citraté n'a pas été testé. Ne pas conserver le sang plus de 3 jours à température ambiante ou plus d'une semaine entre 2 et 8 °C avant utilisation. Ne pas utiliser du sang congelé pendant plus d'un an ou soumis à plus de trois cycles de congélation-décongélation. Pour le prélèvement et le transport des échantillons, suivre la notice d'utilisation du tube de prélèvement sanguin sur EDTA ainsi que les recommandations générales sur les prélèvements sanguins.

Extraction de l'ADN : Amener les échantillons de sang à température ambiante. Mélanger soigneusement en inversant les tubes de prélèvement sanguin plusieurs fois avec précaution. Répéter le mélange à chaque fois avant de prélever une aliquote de sang. Il est recommandé d'utiliser la trousse **Spin Micro DNA Extraction Kit** (Réf. 2-020, ViennaLab) pour isoler l'ADN du sang total. L'utilisation d'autres méthodes d'isolement de l'ADN avec le test α-Globin StripAssay® n'a pas été validée. Si d'autres systèmes d'extraction de l'ADN sont utilisés, la concentration de l'échantillon doit être située dans une plage de 2 à 10 ng/μl et le rapport de $DO_{A260/A280}$, qui mesure la pureté, entre 1,7 et 2,0. Si la concentration d'ADN est supérieure, l'échantillon doit être dilué à une concentration située dans la plage recommandée avant la PCR.

Remarque : l'ADN contenant des inhibiteurs de la PCR et/ou des particules magnétiques issues du système d'extraction par billes peut être réfractaire à l'amplification et doit être dilué à 2 ng/μl en utilisant de l'eau de qualité PCR.

L'ADN extrait doit être conservé entre 2 et 8 °C (pendant une semaine max.) ou entre -30 et -15 °C (longue durée) jusqu'à l'analyse.

2. Amplification *in vitro* (PCR) – 3 réactions distinctes par échantillon

Important : conserver tous les réactifs pour PCR et les matrices d'ADN au réfrigérateur tout au long de la procédure.

- Préparer à chaque fois une quantité suffisante de solution de travail fraîche (1/15, concentration finale de 0,33 U/μl) de **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, bouchon rouge) dans du **Taq Dilution Buffer** (bouchon transparent) pour le nombre d'échantillons à analyser et pour le **contrôle sans matrice** (NTC, no-template control).

composant	par réaction	p. ex. 10 réactions
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,33 μl	3,3 μl
Taq Dilution Buffer	4,67 μl	46,7 μl
solution de travail	5 μl	50 μl

- Préparer trois microtubes pour chaque échantillon à amplifier. Placer les microtubes sur de la glace.
- Pour chaque échantillon, préparer 3 mélanges finaux pour PCR (A1, A2 et B) sur de la glace :
 - A1 : **15 μl Amplification Mix A1** (bouchon jaune)
5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluée (1,66 U)
5 μl matrice d'ADN
 - A2 : **15 μl Amplification Mix A2** (bouchon blanc)
5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluée (1,66 U)
5 μl matrice d'ADN
 - B : **15 μl Amplification Mix B** (bouchon vert)
5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluée (1,66 U)
5 μl matrice d'ADN

Remarque : il est recommandé de préparer un Master Mix pour tous les échantillons contenant un Amplification Mix et l'HS-Taq DNA Polymerase diluée. Commencer par pipeter 20 μl de Master Mix dans chaque microtube pour PCR, puis ajouter la matrice d'ADN. Inclure un contrôle sans matrice à chaque analyse en utilisant de l'eau de qualité PCR à la place d'ADN (ou de préférence le contrôle négatif de votre extraction d'ADN).

En général, préparer les solutions de travail/le Master Mix avec un volume excédentaire de 10 % pour compenser les inexactitudes de pipetage.

- Boucher les microtubes hermétiquement. Préchauffer le thermocycleur à 95 °C.
- Déposer les microtubes dans le thermocycleur et exécuter le programme suivant :
 - pré-PCR : 95 °C/5 min**
 - thermocyclage : 97 °C/40 s - 64 °C/40 s - 72 °C/1 min 30 s (3 cycles)**
97 °C/40 s - 58 °C/40 s - 72 °C/1 min 30 s (37 cycles)
 - élongation terminale : 72 °C/5 min**
- Conserver les produits d'amplification sur de la glace ou entre 2 et 8 °C pour utilisation ultérieure.

Facultatif : analyser les produits d'amplification par électrophorèse sur gel (p. ex. 3 % de gel d'agarose).

Longueurs des fragments : 881 bp ; délétions : 1783 bp (A1)
 296 bp ; délétions : 250, 329, 373, 474, 578, 1025 bp (A2)
 302, 864 bp ; délétions : 1772 bp (B)

3. Traitement des Teststrips

3.1. Hybridation (manuelle) – 2 Teststrips par échantillon (45 °C, bain-marie à agitation)

Important : ajuster le niveau de l'eau du bain-marie à environ la moitié de la hauteur du Typing Tray. Chauffer le bain-marie à 45 °C exactement. Vérifier la température de l'eau avec un thermomètre calibré. Préchauffer l'Hybridization Buffer et la Wash Solution A à 45 °C. Veiller à ce que tous les précipités qui se sont formés entre 2 et 8 °C soient entièrement dissous. Amener les Teststrips, le DNAT, la Conjugate Solution, la Wash Solution B et le Color Developer à température ambiante. Préparer le(s) Typing Tray(s).

Retirer une Teststrip A et une Teststrip B pour chaque échantillon en utilisant des pincettes propres. Les Teststrips ne doivent être manipulées qu'avec des gants non poudrés ! Étiqueter les Teststrips en dehors des lignes de marquage avec un crayon à papier (éviter les crayons-billes, les marqueurs, etc.).

Pour toutes les **Teststrips A** (un couloir par échantillon) :

- Pipeter **20 µl de DNAT** (bouchon bleu) dans le coin inférieur de chaque couloir du ou des Typing Trays.
- Ajouter **10 µl de produit d'amplification A1** à la goutte de DNAT correspondante.
- Ajouter **10 µl de produit d'amplification A2** à la même goutte.
- Mélanger soigneusement avec une pipette.
(La solution reste bleue).

Pour toutes les **Teststrips B** (un couloir par échantillon) :

- Pipeter **10 µl de DNAT** (bouchon bleu) dans le coin inférieur de chaque couloir du Typing Trays.
- Ajouter **10 µl de produit d'amplification B** à la goutte de DNAT correspondante.
- Mélanger soigneusement avec une pipette.
(La solution reste bleue).

- Laisser reposer **5 min** à température ambiante.
- Ajouter **1 ml d'Hybridization Buffer** (préchauffé à 45 °C) dans chaque couloir. Agiter légèrement la plaque. (La couleur bleue disparaîtra).
- Déposer la **Teststrip A** ou la **Teststrip B**, marquage vers le haut (lignes visibles !), dans les couloirs correspondants. Immerger complètement.
- Incuber pendant **30 min** à **45 °C** sur le plateau d'agitation du bain-marie.

Sélectionner une fréquence d'agitation modérée (env. 50 tr/min) pour éviter tout déversement. Fermer le couvercle du bain-marie pour éviter des variations de la température.

- À la fin de l'incubation, retirer les solutions d'hybridation par aspiration ou pipetage.

Procéder immédiatement. Ne pas laisser les Teststrips s'assécher au cours de la procédure.

3.2. Lavage stringent (45 °C, bain-marie à agitation)

- Ajouter **1 ml de Wash Solution A** (préchauffée à 45 °C). Rincer brièvement (10 s). Retirer les liquides par aspiration ou pipetage.
- Ajouter **1 ml de Wash Solution A** (45 °C).
- Incuber pendant **15 min** à **45 °C** dans le bain-marie à agitation. Retirer les liquides par aspiration ou pipetage.
- Ajouter **1 ml de Wash Solution A** (45 °C).
- Incuber pendant **15 min** à **45 °C** dans le bain-marie à agitation. Retirer les liquides par aspiration ou pipetage.

3.3. Détection colorimétrique (température ambiante : 22 °C ± 3 °C)

- Ajouter **1 ml de Conjugate Solution**.
- Incuber pendant **15 min à température ambiante** sur un agitateur linéaire ou orbital.
Retirer les liquides par aspiration ou pipetage.
- Ajouter **1 ml de Wash Solution B**. Rincer brièvement (10 s).
Retirer les liquides par aspiration ou pipetage.
- Ajouter **1 ml de Wash Solution B**.
- Incuber pendant **5 min à température ambiante** sur un agitateur linéaire ou orbital.
Retirer les liquides par aspiration ou pipetage.
- Ajouter **1 ml de Wash Solution B**.
- Incuber pendant **5 min à température ambiante** sur un agitateur linéaire ou orbital.
Retirer les liquides par aspiration ou pipetage.
- Ajouter **1 ml de Color Developer**.
- Incuber pendant **15 min à température ambiante** dans l'obscurité sur un agitateur linéaire ou orbital.
Une coloration violette apparaît en cas de réaction positive.
- Laver les Teststrips plusieurs fois avec de l'eau distillée.
Les laisser sécher dans l'obscurité sur du papier absorbant.

Ne pas exposer les Teststrips à la lumière vive après la coloration.

3.4. Hybridation (automatisée) - facultative, à la place du bain-marie et de l'agitateur

L'instrument destiné au traitement automatisé des Teststrips doit remplir les critères suivants :

- Température et durée programmables conformément aux étapes 3.1 à 3.3 de la procédure de test StripAssay®.
- Station de préchauffage intégrée pour le Hybridization Buffer et la Wash Solution A.
- Maintien de la température des plaques à 45 °C ± 1 °C pendant les étapes d'hybridation et de lavage stringent.
- Système de refroidissement actif pour la plaque permettant une baisse rapide de la température en vue des étapes de détection colorimétrique à température ambiante.
- Fonction d'agitation pour la plaque.
- Couvercle chauffant pour la plaque afin d'éviter l'évaporation des réactifs pendant l'incubation.
- Distribution de volumes de réactifs définis.
- Aspiration des réactifs.
- Des réactifs supplémentaires peuvent être nécessaires selon l'instrument utilisé et le nombre d'échantillons traités lors d'une analyse. Des StripAssay® Detection Reagents pour la réalisation de 20 tests (REF CS-012) et 48 tests (REF CS-017) sont vendus séparément.

VII. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le génotype d'un échantillon est déterminé à partir des Teststrips A et B correspondantes en utilisant la Collector™ Sheet fournie. Placer les deux Teststrips traitées dans les champs correspondants, les aligner sur le schéma à l'aide de la ligne rouge (en haut) et de la ligne verte (en bas) et les fixer avec du ruban adhésif.

Une réaction positive sur la ligne de contrôle la plus haute indique que la Conjugate Solution et le Color Developer ont eu l'effet escompté. Cette ligne doit toujours avoir une coloration positive.

Une réaction positive sur les lignes de contrôle PCR A et B indique la présence des produits d'amplification adéquats. Ces lignes doivent toujours être positives, sauf pour le contrôle sans matrice, qui contient de l'eau à la place de la matrice d'ADN (voir exemple H, page 18).

L'absence de lignes de contrôle PCR sur les Teststrips peut indiquer une hybridation incorrecte des produits d'amplification Mix A1/A2 sur la Teststrip B et des produits d'amplification Mix B sur la Teststrip A. Renouveler le test.

Pour chaque position polymorphique, l'un des motifs de coloration suivants (Fig. 2) doit être obtenu :

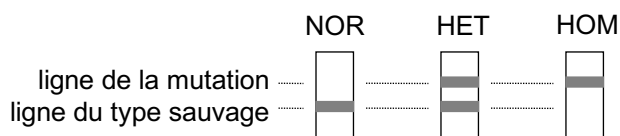


Fig. 2 : Génotypes - motifs de coloration sur la teststrip

	ligne du type sauvage	ligne de la mutation	génotype
NOR	positive	négative	normal
HET	positive	positive	hétérozygote
HOM	négative	positive	mutation homozygote

Remarque : la coloration des lignes positives peut varier en intensité. Cela n'influe pas sur le résultat.

Se reporter à la page 18 (Fig. 3) pour **voir des exemples** de résultats du test StripAssay®.

Certaines mutations ponctuelles couvertes par le test α-Globin StripAssay® se situent à quelques nucléotides du gène de l'α-globine. Sur les Teststrips, celles-ci sont représentées par une sonde commune de type sauvage, de sorte que les 21 mutations ne sont couvertes que par 9 sondes de type sauvage :

ligne	sonde de type sauvage	mutation
10	α1 cd 14	α1 cd 14 [G>A]
11	α1 cd 59	Hb Adana
25	α2 init cd	α2 init cd [T>C]
26	α2 cd 19	α2 cd 19 [-G]
27	α2 IVS 1	α2 IVS 1 -5nt
28	α2 cd 59	α2 cd 59 [G>A]
29	α2 cd 125	Hb Quong Sze
30	α2 cd 142	Hb Constant Spring, Hb Icaria, Hb Pakse, Hb Koya
31	α2 poly A	α2 poly A-1, α2 poly A-2

Les échantillons présentant une hétérozygotie composite pour deux de ces mutations (par exemple Hb Constant Spring + Hb Pakse) ne seront pas accompagnés du signal commun de type sauvage (voir exemple E, page 18).

Les échantillons présentant une hétérozygotie composite pour l'une des mutations α1/α2 et une délétion génétique simple ou double ne seront généralement pas accompagnés du signal de type sauvage correspondant (voir exemple D, page 18).

Pour les délétions génétiques simples et doubles, plusieurs sondes de type sauvage permettent de distinguer l'état hétérozygote de l'état homozygote mutant (voir exemples B et C, page 18) :

délétion	hétérozygote	mutation homozygote
- 3.7	présence de tous les signaux de type sauvage	absence des signaux 25-31 de type sauvage
- 4.2	présence de tous les signaux de type sauvage	absence des signaux 25-31 de type sauvage
- 20.5 kb	présence de tous les signaux de type sauvage	absence des signaux 10 et 25-31 de type sauvage
-- MED-I	présence de tous les signaux de type sauvage	absence de tous les signaux de type sauvage
-- SEA	présence de tous les signaux de type sauvage	absence de tous les signaux de type sauvage
-- THAI	présence de tous les signaux de type sauvage	absence de tous les signaux de type sauvage
-- FIL	présence de tous les signaux de type sauvage	absence de tous les signaux de type sauvage

Comme pour tout test diagnostique, les résultats du test α-Globin StripAssay® doivent être interprétés en tenant compte du phénotype clinique général du patient et à la lumière des autres investigations médicales à la disposition du médecin. ViennaLab Diagnostics GmbH n'est pas responsable des décisions cliniques qui sont prises.

VIII. ÉVALUATION DES PERFORMANCES

L'**exactitude** du test α-Globin StripAssay® a été déterminée en analysant 330 échantillons d'ADN génomique préalablement génotypés. À l'exception d'un échantillon, les résultats étaient conformes à la méthode de référence (séquençage Sanger, gap-PCR, ARMS-PCR, reverse dot-blot analysis, échantillons résultant d'une évaluation externe de la qualité). Un échantillon polyA-2 hétérozygote, issu d'une rare recombinaison des extrémités 3' des gènes *alpha-2* et *pseudo-alpha*, a été identifié comme faux négatif (type sauvage) par le StripAssay®. Le test a correctement détecté 359 allèles mutants (taux de concordance positive de 99,7 %) et 300 allèles de type sauvage (taux de concordance négative de 100 %).

La **précision** du test α-Globin StripAssay® a été évaluée en mesurant la variabilité entre les réplicats, les opérateurs, les jours, les thermocycleurs et les dispositifs d'hybridation utilisés. Sur un total de 62 tests effectués avec les paramètres étudiés, 61 ont donné les résultats de génotypage attendus, et un échantillon a été rejeté en raison d'une erreur de pipetage de la matrice d'ADN. Seules des différences négligeables dans l'intensité de la coloration des Teststrips sont apparues, et aucune coloration de fond n'a été observée. Le test α-Globin StripAssay® a été validé sur l'AB GeneAmp® PCR System 2700, le MJ Research PTC-200 et l'Eppendorf Mastercycler X50s, ce qui correspond à des vitesses de chauffage et de refroidissement comprises entre 1,7 et 6,3 °C/s et 1,4 et 3,7 °C/s, respectivement.

L'utilisation d'autres thermocycleurs requiert une vérification.

La **spécificité analytique** est assurée en premier lieu par la sélection des amorces spécifiques d'un gène et des sondes de capture spécifiques d'un allèle, ainsi que par des conditions de réaction stringentes. Les amorces et les sondes ont été vérifiées par analyse comparative de séquences pour déceler les homologies possibles avec toutes les séquences publiées dans les bases de données génétiques. Cela a permis de garantir la détectabilité de tous les génotypes recherchés. La réactivité croisée potentielle entre les sondes de capture a été vérifiée par l'hébergement du fragment de gène correspondant sur l'ADN synthétique. Aucune réactivité croisée n'a été observée.

Performances cliniques : lors d'une étude comparative multicentrique (Puehringer et al. 2007), 272 échantillons patient issus des laboratoires de prélèvement de huit centres spécialisés dans la prise en charge de la thalassémie dans le monde ont été analysés à l'aide du test α-Globin StripAssay® et des méthodes de référence habituellement utilisées dans ces centres. Sur les 544 allèles d'α-globine de type sauvage ou mutant retrouvés dans la cohorte étudiée, les résultats obtenus étaient parfaitement concordants pour 523 (96,14 %) d'entre eux entre le StripAssay® et les méthodes internes des centres.

IX. SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Cinq substances interférentes (hémoglobine, immunoglobuline G, traces de sang, éthanol et EDTA) potentiellement présentes dans les préparations d'ADN dérivées d'échantillons sanguins sur EDTA ont été testées. Leurs effets sur la PCR ont été évalués sur trois échantillons d'ADN purifiés additionnés de ces substances en concentrations diverses et comparés à leurs contrôles sans ajout de substances interférentes. Tous les échantillons ont été analysés à trois reprises.

Des concentrations finales < 10 µM d'hémoglobine, de 0,1 µM d'immunoglobuline G, < 1 % de sang périphérique, de 1,25 % d'éthanol ou de 0,1 mM d'EDTA dans la réaction n'ont pas interféré avec les performances du StripAssay®.

X. LIMITES DU TEST

Le test α-Globin StripAssay® est exclusivement conçu pour le diagnostic des 21 mutations connues énumérées dans la rubrique III, lesquelles sont représentées par des sondes de capture spécifiques à l'allèle sur les Teststrips. D'autres délétions, mutations ponctuelles ou recombinaisons de l'α-globine potentiellement présentes dans un échantillon patient ne peuvent pas être détectées. Dans le meilleur des cas, la présence d'une mutation ponctuelle ignorée dans la séquence couverte par une sonde de capture peut être indiquée par la perte du signal de type sauvage sur la Teststrip, si cette mutation est présente en même temps qu'une délétion génétique simple ou double, ou à l'état homozygote.

Les variants rares ou privés situés au niveau des sites de liaison des amorces et des sondes, de même que les conversions géniques peuvent entraîner un échec de l'amplification et l'absence de certains signaux sur les Teststrips.

Le test α-Globin StripAssay® ne permet pas de distinguer l'état mutant hétérozygote et homozygote du gène anti-3.7 tripliqué (anti-3.7/αα et anti-3.7/anti-3.7).

En présence de grandes délétions génétiques non détectables par le test, les délétions génétiques uniques (-3.7 ou -4.2) et les mutations ponctuelles apparaissent comme homozygotes.

Le test α-Globin StripAssay® ne doit pas être utilisé à des fins de diagnostic prénatal ou de diagnostic génétique préimplantatoire. Le test n'a pas été validé sur des échantillons issus de prélèvements de villosités chorales, de liquide amniotique ou de sang de cordon ombilical.

Le test α-Globin StripAssay® est conçu pour une utilisation professionnelle en laboratoire uniquement.

XI. CONSIDÉRATIONS RELATIVES À LA QUALITÉ

- Une parfaite compréhension de la procédure décrite ici, ainsi que des techniques de laboratoire standard et de l'équipement approprié à utiliser est nécessaire pour obtenir des résultats fiables.
- Ne pas utiliser les trousses StripAssay® au-delà de leur date de péremption.
- Après ouverture du contenant principal, les réactifs StripAssay® sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette extérieure de la trousse lorsqu'ils sont conservés de manière appropriée entre 2 et 8 °C.
- Utiliser des embouts de pipette jetables stériles munis de filtres pour éviter toute contamination microbienne et contamination croisée des réactifs ou des échantillons. Ne pas permuter les bouchons des flacons.
- Usage unique.

XII. SÉCURITÉ

- Ne pas boire, manger, fumer ou utiliser des cosmétiques dans les zones de travail réservées. Porter une blouse de laboratoire et des gants jetables lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de la trousse. Se laver soigneusement les mains une fois la procédure terminée.
- Manipuler les échantillons comme s'ils pouvaient potentiellement transmettre des agents infectieux. Nettoyer et désinfecter soigneusement tous les matériels et toutes les surfaces qui ont été en contact avec les échantillons. Éliminer tous les déchets associés aux échantillons cliniques dans un récipient pour déchets biologiques dangereux.
- Éviter le contact du DNAT et du Color Developer avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, laver abondamment à l'eau immédiatement. En cas de déversement, diluer avec de l'eau avant d'essuyer et de sécher.
- Respecter toutes les réglementations locales et fédérales applicables en matière de sécurité et de protection de l'environnement.

XIII. ASSISTANCE TECHNIQUE

Pour obtenir une assistance technique :

- S'adresser au distributeur local de ViennaLab Diagnostics (www.viennalab.com/distribution).
- Visionner les didacticiels vidéo (www.viennalab.com/support).
- Consulter le manuel du StripAssay® (www.viennalab.com/support).
- Consulter le guide de dépannage du StripAssay® (www.viennalab.com/support).
- Contacter techhelp@viennalab.com.













XIV. RÉFÉRENCES

- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man (www.omim.org)
- Base de données HbVar (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>)
- Thalassemia International Federation (www.thalassaemia.org.cy)
- Ithamet (www.ithamet.eu)
- Puehringer et al. Clin Chem Lab Med 2007;45(5):605-10

XV. SIGNALEMENT AU FABRICANT

Tout incident grave survenant en lien avec le StripAssay® doit être signalé aux autorités compétentes du pays et au fabricant.

XVI. SYMBOLES

	Numéro de catalogue
	Numéro de lot
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Conforme à la réglementation européenne relative aux DMDIV 2017/746
	Numéro d'identification de l'organisme notifié
	Réalisation de <n> tests
	Limites de température de conservation
	Date de péremption
	Mise en garde
	Fabricant
	Date de fabrication
	Consulter la notice d'utilisation

XVII. EXEMPLES DE RÉSULTATS DE TEST

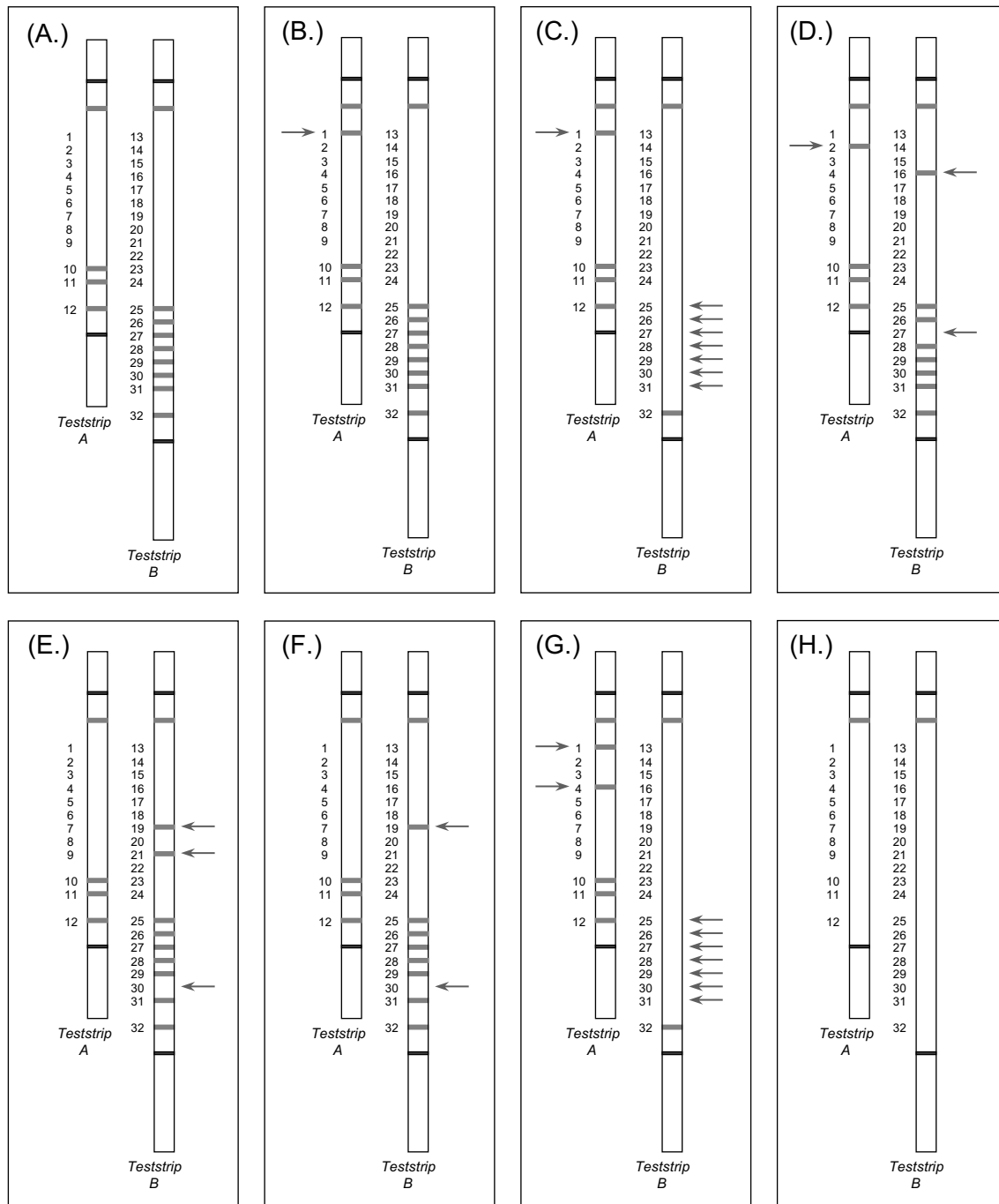



Fig. 3 : Exemples de résultats obtenus avec le test α-Globin StripAssay®

- (A.) normal (αα/αα)
- (B.) -3.7 hétérozygote (-3.7/αα)
- (C.) -3.7 homozygote (-3.7/-3.7)
- (D.) -4.2 + IVS1-5nt hétérozygote (-4.2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse hétérozygote (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring homozygote (HbCS/HbCS)
- (G.) -3.7 + --MED-I hétérozygote (-3.7/--MED-I)
- (H.) contrôle négatif ou échec de la PCR

REMARQUES

XVIII. PRODUITS CONNEXES

REF		
4-125	β -Globin StripAssay [®] AZE1	20 tests
4-126	β -Globin StripAssay [®] AZE2	20 tests
4-130	β -Globin StripAssay [®] MED	20 tests
4-140	β -Globin StripAssay [®] IME	20 tests
4-150	β -Globin StripAssay [®] SEA	20 tests
4-160	α -Globin StripAssay [®]	10 tests
4-170	β -Thal Modifier StripAssay [®]	20 tests
CS-012	StripAssay [®] Detection Reagents	20 tests
CS-017	StripAssay [®] Detection Reagents 48	48 tests
2-014	GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System	100 extractions
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 extractions
6-080	Typing Trays	5

Distributeur :



Fabricant :



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45, A-1120 Vienna, Austria

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com