

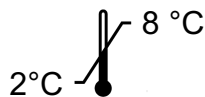
α -Globin StripAssay[®]

Instrucciones de uso

REF



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



IVD



Versión: rev 1.3/Español
eIFU y otros idiomas disponibles en
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

ÍNDICE

I.	FINALIDAD PREVISTA.....	4
II.	ANTECEDENTES	4
III.	METODOLOGÍA.....	4
IV.	COMPONENTES DEL KIT	6
V.	MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS	7
VI.	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	8
VII.	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	12
VIII.	EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO	14
IX.	SUSTANCIAS INTERFERENTES	14
X.	LIMITACIONES DEL ENSAYO	15
XI.	CONSIDERACIONES SOBRE CALIDAD	15
XII.	SEGURIDAD	15
XIII.	ASISTENCIA TÉCNICA	16
XIV.	REFERENCIAS	16
XV.	COMENTARIOS PARA EL FABRICANTE.....	16
XVI.	SÍMBOLOS.....	17
XVII.	EJEMPLOS DE RESULTADOS DE PRUEBA	18
XVIII.	PRODUCTOS RELACIONADOS	20

HISTORIAL DE REVISIONES:

versión	fecha	descripción
rev 1.1	2022-02	Marcado CE con n.º de identificación del organismo notificado; vínculo a SSP; declaración de origen de muestra y uso manual o semiautomático (I); especificación de los componentes del kit (IV); datos de funcionamiento clínico (VIII)
rev 1.2	2022-05	Se incluyó fecha de emisión y referencia a la IFU electrónica (eIFU), Iran (II)
rev 1.3	2022-11	Se mejoró la disposición y resolución de las figuras

El Resumen de seguridad y funcionamiento (SSP, Summary of Safety and Performance) de StripAssay® se puede obtener en la European Database on Medical Devices (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> o solicitar al fabricante.

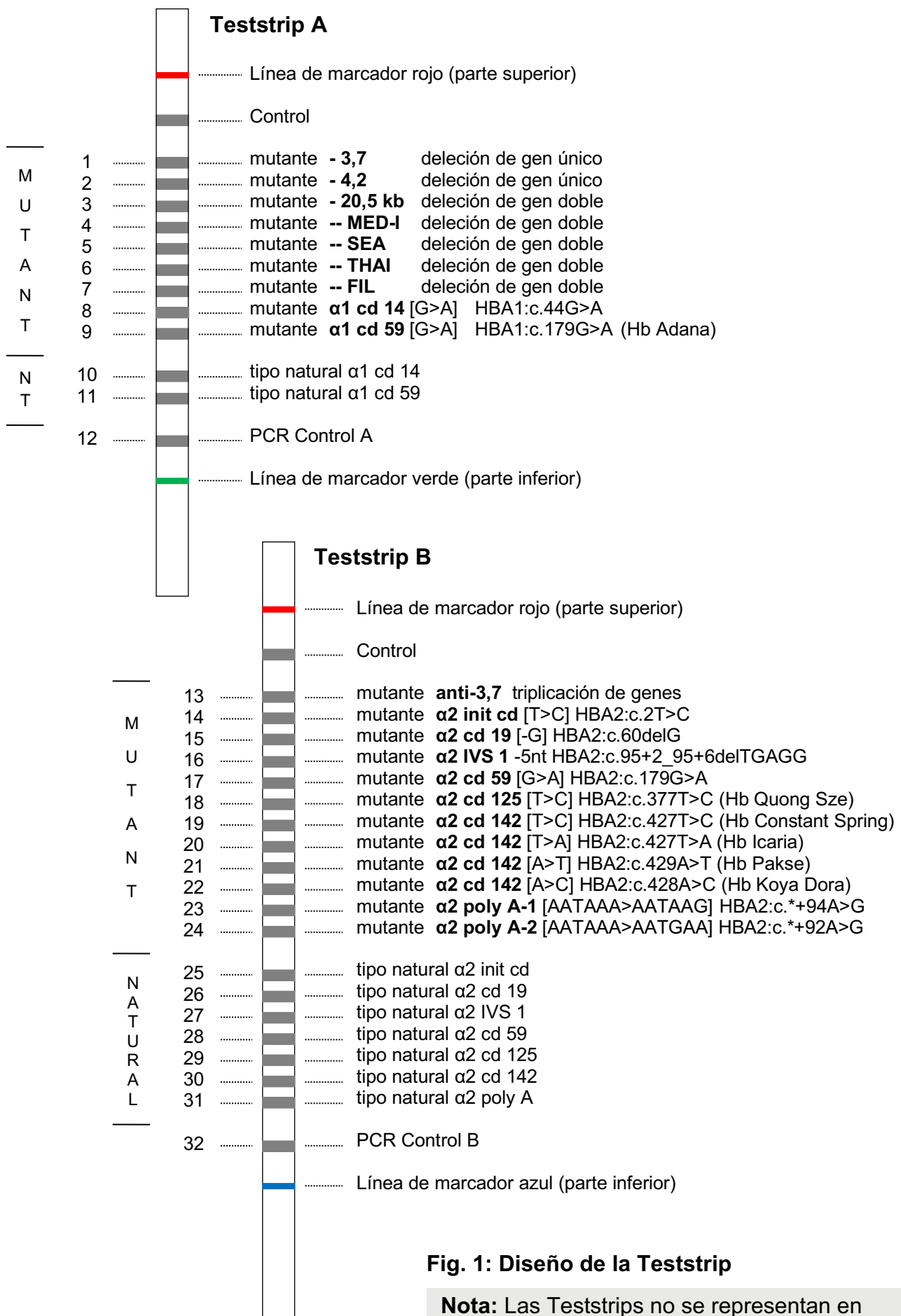


Fig. 1: Diseño de la Teststrip

Nota: Las Teststrips no se representan en tamaño real, por lo que no deben utilizarse para la interpretación de resultados.

I. FINALIDAD PREVISTA

α -Globin StripAssay® es una prueba genética cualitativa para análisis específico de 21 deleciones grandes y mutaciones puntuales frecuentes de los genes de la *subunidad de hemoglobina alfa 1 (HBA1, hemoglobin subunit alpha 1)* y *alfa 2 (HBA2, hemoglobin subunit alpha 2)* en ADN aislado de sangre periférica humana. La prueba se utiliza como referencia para confirmar genéticamente un posible diagnóstico de alfatalasemia (talasemia α). Asimismo, el ensayo se puede utilizar para cribado del estado de portador de talasemia en los familiares del paciente y la población general. Las pruebas StripAssay® se pueden realizar de forma manual o semiautomática.

Para uso en diagnóstico humano *in vitro*.

II. ANTECEDENTES

Las mutaciones en los genes de la *α -globina* son la causa genética de la alfatalasemia, un afección autosómica recesiva hereditaria, que se caracteriza por la falta de producción o producción insuficiente de cadenas de alfa globina, lo que da lugar a un cuadro clínico variable dependiendo del número de alelos afectados.

Se deberá analizar a pacientes con valores hematológicos característicos de anemia microcítica y los patrones de hemoglobina correspondientes, familiares de un paciente afectado, futuros padres, así como a individuos de poblaciones de alto riesgo (p. ej., región mediterránea, África, península arábiga, Irán, India y Sudeste Asiático) que presenten riesgo de ser portadores de alfatalasemia.

III. METODOLOGÍA

La prueba StripAssay® se basa en los procesos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) e hibridación inversa. El procedimiento incluye tres pasos: (1) Aislamiento del ADN, (2) amplificación de la PCR mediante cebadores biotinilados, (3) hibridación de productos de amplificación en una Teststrip que contenga sondas de oligonucleótidos alelo específicas inmovilizadas como una matriz de líneas paralelas (Fig. 1). Las secuencias biotiniladas unidas se detectan mediante sustratos de color y fosfatasa alcalina-estreptavidina.

La prueba α-Globin StripAssay® permite detectar las siguientes mutaciones del locus del gen de la α-globina:

	Nombre anterior	Nomenclatura HGVS	Ref. SNP
1	-3,7 kb	NG_000006.1:g.34164_37967del3804	--
2	-4,2 kb	n.d.	--
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	Triplicación de genes anti-3,7	n.d.	--
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

Secuencia de referencia (RefSeq, Reference Sequence):

NG_000006.1



NM_000558.3 (HBA1)

NM_000517.4 (HBA2)

La prueba se puede llevar a cabo de forma manual o semiautomática mediante los instrumentos designados para la automatización del procesamiento de Teststrip (véase la sección VI. 3.4).

IV. COMPONENTES DEL KIT

REF

	4-160	4-160-A	4-160 -TRIAL
1a. Amplification Mix A1 (tapa amarilla)	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
1b. Amplification Mix A2 (tapa blanca)	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
1c. Amplification Mix B (tapa verde)	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
2. Taq Dilution Buffer (tapa transparente)	500 µl	500 µl	500 µl
3. HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (tapa roja)	125 U	175 U	125 U
4. DNAT (tapa azul)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Advertencia: DNAT incluye NaOH al 1,6 % H315: Provoca irritación cutánea H319: Provoca irritación ocular grave P280: Se deben usar guantes/prendas/gafas/máscara de protección P337 + P313: Si persiste la irritación ocular: Se debe acudir/consultar a un médico</p>			
5. Typing Trays	3	---	2
6a. Teststrips A (tapa negra)	10	24	5
6b. Teststrips B (tapa blanca)	10	24	5
7. Hybridization Buffer (tapa blanca)	25 ml	65 ml	25 ml
8. Wash Solution A (tapa blanca)	80 ml	200 ml	80 ml
9. Conjugate Solution (tapa transparente)	25 ml	65 ml	25 ml
10. Wash Solution B (tapa transparente)	80 ml	200 ml	80 ml
11. Color Developer (tapa marrón)	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Advertencia: Color Developer contiene ≤0,4 % de ácido maleico H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel P280: Se deben usar guantes/prendas/gafas/máscara de protección P302 + P352: En caso de contacto con la piel: lavar con abundante agua P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: se debe acudir/consultar a un médico</p>			
12. Instrucciones de uso	1	1	1
13. Collector™ Sheet	1	3	1

Nota: Conserve todos los reactivos a entre 2 °C y 8 °C cuando no los utilice.

Nombre del componente	Composición
Amplification Mix A1/A2/B	Oligonucleótidos marcados con 5'-biotina de secuencia específica, una mezcla equimolar de trifosfatos desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), MgCl ₂ , tampón de sulfato de amonio, betaína, azida de sodio al 0,05 %
Taq Dilution Buffer	Tampón para HS-Taq DNA Polymerase, que incluye KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ y MgCl ₂ , azida de sodio al 0,05 %
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	hot-start-Taq DNA polymerase a una concentración de 5 U/µl
DNAT	Solución básica que contiene hidróxido sódico al 1,6 % y un colorante que indica un cambio en el pH
Typing Trays	Bandeja de plástico con ocho pocillos

Nombre del componente	Composición
Teststrips A/B	Sondas de oligonucleótidos aleloespecíficas, control para reacciones PCR positivas y control de hibridación inmovilizado como una matriz de líneas paralelas en una membrana reforzada con poliéster, demarcada por una línea roja en la parte superior y una verde (Teststrip A) o azul (Teststrip B) en la inferior
Hybridization Buffer	Tampón de fosfato con <2 % de detergente
Wash Solution A	Tampón de citrato con <1 % de detergente
Conjugate Solution	Fosfatasa alcalina conjugada en estreptavidina y diluida en un tampón de base salina con azida de sodio al 0,05 %
Wash Solution B	Tampón Tris con detergente a <2 % y azida de sodio al 0,05 %
Color Developer	El sustrato de color para la fosfatasa alcalina contiene nitroazul de tetrazolio (NBT, nitro blue tetrazolium) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
Instrucciones de uso	Documento en papel impreso
Collector™ Sheet	Documento en papel impreso

V. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Además del equipo estándar para laboratorio de biología molecular, se precisa lo siguiente:

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- Termociclador con tapa calefactada (para obtener especificaciones sobre las velocidades de rampa, consulte la sección VIII)
- Baño de agua con agitación, tapa y temperatura ajustable ($45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$)
- Agitador (balancín o agitador orbital)

Opcional:

- Instrumento de aspiración de vacío
- Termoagitador para formato de placa de microvaloración con tapa y temperatura ajustable ($45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), p. ej., PST-60 HL (Biosan) o dispositivo equivalente
- Instrumento para hibridación automática, ajustable al perfil de temperatura/tiempo especificado en la sección VI. 3.4, p. ej., DYNABLOT Heat (Dynex) o dispositivo equivalente
- Equipo de electroforesis en gel de agarosa (para control de los productos de amplificación)

VI. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Preparación de muestras

Muestra: use sangre fresca o congelada con anticoagulante EDTA. El ensayo no se ha probado con sangre que contenga citrato ni heparina. No almacene sangre durante más de 3 días a temperatura ambiente ni durante más de 1 semana a entre 2 °C y 8 °C antes de su uso. No se debe utilizar sangre que se haya mantenido congelada durante más de un año o que se haya sometido a más de tres ciclos de congelación-descongelación. En lo que respecta a la recogida y transporte de muestras, siga las instrucciones de uso del tubo de recogida de sangre con EDTA y las recomendaciones generales para la obtención de muestras de sangre.

Extracción de ADN: Deje que las muestras de sangre alcancen la temperatura ambiente. Mezcle bien; para ello, invierta varias veces con cuidado los tubos de recogida de sangre. Repita la mezcla cada vez antes de retirar una parte alícuota de sangre. Se recomienda utilizar el **Spin Micro DNA Extraction Kit** (REF 2-020, ViennaLab) a fin de aislar ADN a partir de sangre entera. El uso de otros métodos de aislamiento de ADN con α -Globin StripAssay® no se ha validado. En caso de utilizar otros sistemas de extracción de ADN, la concentración y pureza del ADN debe encontrarse dentro de un intervalo de 2 a 10 ng/ μ l y con una proporción de $OD_{A260/280}$ de 1,7 a 2,0, respectivamente. Las concentraciones mayores de ADN deberán diluirse hasta el intervalo recomendado antes de someterse a PCR.

Nota: El ADN que contiene inhibidores de PCR y/o partículas magnéticas derivadas de un sistema de extracción basado en microesferas puede ser refractario a la amplificación, por lo que debe diluirse en 2 ng/ μ l mediante agua de calidad para PCR.

El ADN extraído se debe conservar a entre 2 °C y 8 °C (una semana como máximo) o entre -30 °C y -15 °C (a largo plazo) hasta que el análisis se lleve a cabo.

2. Amplificación *in vitro* (PCR): 3 reacciones por muestra

Importante: Mantenga todos los reactivos de PCR y plantillas de ADN refrigerados durante todo el proceso.

- Cada vez que repita el procedimiento, vuelva a preparar una cantidad apropiada de solución de trabajo (1:15, conc. final 0,33 U/μl) de **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, tapa roja) en **Taq Dilution Buffer** (tapa transparente) para el número de muestras que se van a analizar, más el **control sin plantilla** (NTC, no-template control).

Componente	Por reacción	p. ej., 10 reacciones
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,33 μl	3,3 μl
Taq Dilution Buffer	4,67 μl	46,7 μl
Solución de trabajo	5 μl	50 μl

- Prepare tres tubos de reacción para cada muestra que se amplificará. Coloque los tubos en hielo.
- Para cada muestra, prepare 3 mezclas de reacción PCR final (A1, A2, B) en hielo:
 - A1: **15 μl Amplification Mix A1** (tapa amarilla)
5 μl de HS-Taq DNA Polymerase diluida (1,66 U)
5 μl de plantilla de ADN
 - A2: **15 μl Amplification Mix A2** (tapa blanca)
5 μl de HS-Taq DNA Polymerase diluida (1,66 U)
5 μl de plantilla de ADN
 - B: **15 μl Amplification Mix B** (tapa verde)
5 μl de HS-Taq DNA Polymerase diluida (1,66 U)
5 μl de plantilla de ADN

Nota: Se recomienda preparar una mezcla maestra para todas las muestras que contienen HS-Taq DNA Polymerase diluida y Amplification Mix. En primer lugar, pipetee 20 μl de la mezcla maestra en cada tubo de PCR y después agregue la plantilla de ADN. Incluya un control sin plantilla en cada serie; para ello, utilice agua de calidad PCR en lugar de ADN (o, preferiblemente, el control negativo de su extracción de ADN).

En general, prepare las soluciones de trabajo/mezcla maestra con un volumen que supere el 10 % para compensar las imprecisiones de pipeteado.

- Tape bien los tubos. Precaliente el termociclador a 95 °C.
- Inserte los tubos de reacción y ejecute el siguiente programa de termociclado:
 - Previo a la PCR: 95 °C/5 min**
 - Termociclado: 97°C/40 s - 64°C/40 s - 72 °C/1:30 min (3 ciclos)**
97°C/40 s - 58°C/40 s - 72 °C/1:30 min (37 ciclos)
 - Extensión final: 72°C/5 min**
- Conserve los productos de amplificación en hielo o entre 2 °C y 8 °C para su uso posterior.

Opcional: Analice los productos de amplificación mediante electroforesis en gel (p. ej., gel de agarosa al 3 %).

Longitudes de los fragmentos: 881 bp; deleciones: 1783 bp (A1)
 296 bp; deleciones: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 bp (A2)
 302, 864 bp; deleciones: 1772 bp (B)

3. Procesamiento de las Teststrips

3.1. Hibridación (manual): 2 Teststrips por muestra (45 °C, baño de agua con agitación)

Importante: Ajuste el nivel de agua del baño de agua a aproximadamente la mitad de la altura de la Typing Tray. Caliente el baño de agua hasta 45 °C exactamente. Compruebe la temperatura del agua con un termómetro calibrado. Precaliente el Hybridization Buffer y la Wash Solution A a 45 °C. Procure que todos los precipitados formados a entre 2 °C y 8 °C se disuelvan por completo. Permita que todos los componentes (Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B y Color Developer) alcancen la temperatura ambiente. Prepare una o varias Typing Trays.

Retire una Teststrip A y una Teststrip B para cada muestra con unas pinzas limpias. ¡Las Teststrips solo se deben manipular con guantes sin talco! Etiquete las Teststrips fuera de las líneas de marcador con un lápiz (no utilice marcadores, bolígrafos, etc.).

En todas las **Teststrips A** (un canal por muestra):

- Pipetee **20 µl de DNAT** (tapa azul) en la esquina inferior de cada canal que se vaya a utilizar en las Typing Trays.
- Agregue **10 µl de producto de amplificación A1** a la gota correspondiente de DNAT.
- Agregue **10 µl de producto de amplificación A2** a la misma gota.
- Mezcle bien con una pipeta.
(La solución se mantendrá en color azul).

En todas las **Teststrips B** (un canal por muestra):

- Pipetee **10 µl de DNAT** (tapa azul) en la esquina inferior de cada canal que se vaya a utilizar en las Typing Trays.
- Agregue **10 µl de producto de amplificación B** a la gota correspondiente de DNAT.
- Mezcle bien con una pipeta.
(La solución se mantendrá en color azul).

- Deje reposar durante **5 min** a temperatura ambiente.
- Agregue **1 ml de Hybridization Buffer** (precalentado a 45 °C) a cada canal. Agite suavemente la bandeja. (El color azul desaparecerá).
- Inserte una **Teststrip A** o **Teststrip B** con la parte marcada hacia arriba (líneas visibles) en los canales respectivos. Sumerja por completo.
- Incube durante **30 min a 45 °C** sobre la plataforma de agitación del baño de agua.

Establezca una frecuencia de agitación moderada (aprox. 50 rpm) para evitar derrames. Mantenga cerrada la cubierta del baño de agua para evitar variaciones en la temperatura.

- Al final de la incubación, retire las soluciones de hibridación mediante aspiración por vacío o pipeteo.

Prosiga con el procedimiento inmediatamente. No permita que las Teststrips se sequen durante todo el proceso.

3.2. Lavado completo (45 °C, baño de agua con agitación)

- Añada **1 ml de Wash Solution A** (precalentada a 45 °C). Lave brevemente (10 segundos). Extraiga el líquido mediante aspiración por vacío o pipeteo.
- Agregue **1 ml de Wash Solution A** (45 °C).
- Incube durante **15 min a 45 °C** en el baño de agua con agitación. Extraiga el líquido mediante aspiración por vacío o pipeteo.
- Agregue **1 ml de Wash Solution A** (45 °C).
- Incube durante **15 min a 45 °C** en el baño de agua con agitación. Extraiga el líquido mediante aspiración por vacío o pipeteo.

3.3. Detección colorimétrica (temperatura ambiente, 22 °C ± 3 °C)

- Agregue **1 ml de Conjugate Solution**.
- Incube durante **15 min a temperatura ambiente** en un balancín o agitador orbital. Extraiga el líquido mediante aspiración por vacío o pipeteo.
- Agregue **1 ml de Wash Solution B**. Lave brevemente (10 segundos). Extraiga el líquido mediante aspiración por vacío o pipeteo.
- Agregue **1 ml de Wash Solution B**.
- Incube durante **5 min a temperatura ambiente** en un balancín o agitador orbital. Extraiga el líquido mediante aspiración por vacío o pipeteo.
- Agregue **1 ml de Wash Solution B**.
- Incube durante **5 min a temperatura ambiente** en un balancín o agitador orbital. Extraiga el líquido mediante aspiración por vacío o pipeteo.
- Agregue **1 ml de Color Developer**.
- Incube durante **15 min a temperatura ambiente en la oscuridad** en un en un balancín o agitador orbital. Aparecerá una mancha púrpura tras la reacción positiva.
- Lave las Teststrips varias veces con agua destilada. Permita que las tiras sequen a oscuras en papel absorbente.

No exponga las Teststrips a una luz intensa tras haber agregado Color Development.

3.4. Hibridación (automática): proceso opcional en lugar del baño de agua con agitación

Los instrumentos para el procesamiento automático de las Teststrips deben cumplir los siguientes requisitos:

- Perfil de tiempo y temperatura programable de acuerdo con las secciones 3.1 a 3.3 del procedimiento StripAssay®.
- Estación de precalentamiento integrada para Hybridization Buffer y Wash Solution A.
- Control de temperatura de bandejas durante los pasos de hibridación y lavado completo a 45 °C ± 1 °C.
- Sistema de enfriamiento activo de la bandeja para garantizar una reducción de temperatura rápida en los pasos de detección colorimétrica a temperatura ambiente.
- Capacidad de agitación para la bandeja.
- Tapa calefactada para la bandeja para evitar la evaporación de reactivos durante la incubación.
- Dispensación de volúmenes de reactivo definidos.
- Aspiración de reactivos.
- Dependiendo del instrumento utilizado y del número de muestras procesadas en una secuencia, quizá sean necesarios reactivos adicionales. Hay disponibles StripAssay® Detection Reagents específicos para 20 (REF CS-012) y 48 pruebas (REF CS-017).

VII. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El genotipo de una muestra se determina a partir de las Teststrips A y B correspondientes mediante la Collector™ Sheet incluida. Coloque las dos Teststrips procesadas en los campos designados, alinéelas con la figura esquemática mediante la línea de marcador rojo (parte superior) y la línea de marcador verde o azul (parte inferior) y péguelas con cinta adhesiva.

Una reacción positiva de la línea de control superior indica el funcionamiento correcto de Conjugate Solution y Color Developer. El color de esta línea siempre debe ser positivo.

Una reacción positiva de las líneas PCR Control A y PCR Control B indica la presencia de los productos de amplificación correctos. El color de estas líneas siempre debe ser positivo, con la excepción del control sin plantilla, que contiene agua en lugar de la plantilla de ADN (consulte el ejemplo H, página 18).

La ausencia del control de PCR en las Teststrips quizá indique una falsa hibridación de los productos de amplificación Mix A1/A2 con la Teststrip B y los productos de amplificación Mix B con la Teststrip A. Repita la prueba.

En cada posición polimórfica, se debe obtener uno de los siguientes patrones de tinción (Fig. 2):

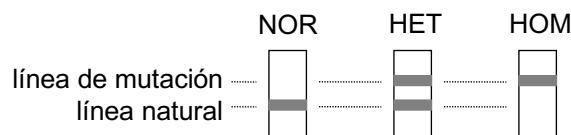


Fig. 2: Genotipos: patrones de tinción en la Teststrip

	línea natural	línea de mutación	genotipo
NOR	positivo	negativo	normal
HET	positivo	positivo	heterocigótico
HOM	negativo	positivo	mutante homocigótico

Nota: Las intensidades de tinción de las líneas positivas pueden variar. Esto no tiene ninguna importancia en relación con el resultado.

Consulte varios ejemplos de resultados de StripAssay® en la página 18 (Fig. 3).

Algunas de las mutaciones puntuales que detecta la prueba α-Globin StripAssay® se encuentran en varios nucleótidos del gen de la *α-globina*. En las Teststrips se representan mediante una sonda de tipo natural común, de forma que las 21 mutaciones queden cubiertas por 9 sondas de tipo natural:

línea	sonda de tipo natural	mutación
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 Quang 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

Las muestras que son heterocigóticas compuestas para dos de estas mutaciones (p. ej., Hb Constant Spring + Hb Pakse) carecerán de la señal de tipo natural común (consulte el ejemplo E, página 18).

Las muestras que son heterocigóticas compuestas para una de las mutaciones α1/α2, y una delección de gen único o doble, carecerán, en la mayoría de los casos, de la señal de tipo natural respectiva (consulte el ejemplo D, página 18).

Para delecciones de gen único y doble, varias sondas de tipo natural diferencian entre el estado de mutación heterocigótica y homocigótica (consulte los ejemplos B y C, página 18):

delección	heterocigótico	mutante homocigótico
- 3,7	todas las señales de WT presentes	Señales de WT 25-31 ausentes
- 4,2	todas las señales de WT presentes	Señales de WT 25-31 ausentes
- 20,5 kb	todas las señales de WT presentes	Señales de WT 10 y 25-31 ausente
-- MED-I	todas las señales de WT presentes	todas las señales de WT ausentes
-- SEA	todas las señales de WT presentes	todas las señales de WT ausentes
-- THAI	todas las señales de WT presentes	todas las señales de WT ausentes
-- FIL	todas las señales de WT presentes	todas las señales de WT ausentes

Al igual que ocurre en cualquier prueba de diagnóstico, los resultados de α-Globin StripAssay® se deben interpretar en el contexto del fenotipo clínico general del paciente y otras investigaciones médicas disponibles para el médico. ViennaLab Diagnostics GmbH no se responsabiliza por las decisiones clínicas tomadas.

VIII. EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO

La **precisión** de α-Globin StripAssay® se determinó mediante un análisis de 330 muestras de ADN genómico pretipadas. Con la excepción de una muestra, los resultados coincidieron con el método de referencia (secuenciación Sanger, gap-PCR, ARMS-PCR, reverse dot-blot analysis, muestras derivadas de EQA). StripAssay® determinó como tipo falso negativo (tipo natural) una muestra heterocigótica polyA-2, que surgió de una rara recombinación de los extremos 3' de los genes *alfa-2* y *pseudo-alfa*. El ensayo detectó correctamente 359 alelos mutantes (= porcentaje de concordancia positiva del 99,7 %) y 300 alelos de tipo natural (= porcentaje de concordancia negativa del 100 %).

La **precisión** de la prueba α-Globin StripAssay® se evaluó como la variabilidad entre réplicas, operadores, días, termocicladores y dispositivos de hibridación. En un total de 62 pruebas realizadas de acuerdo con los parámetros investigados, 61 proporcionaron los resultados de genotipado previstos, y se produjo un resultado fallido en una muestra debido a una imprecisión durante el pipeteo de la plantilla de ADN. Solo fueron visibles diferencias insignificantes en la intensidad de la tinción de Teststrips, y no se observó ninguna tinción de fondo. α-Globin StripAssay® se validó en los equipos AB GeneAmp® PCR System 2700, MJ Research PTC-200 y Eppendorf Mastercycler X50s, lo que equivale a un índice de calentamiento y enfriamiento dentro de los intervalos de 1,7 a 6,3 °C/s y 1,4 a 3,7 °C/s, respectivamente.

El usuario deberá realizar una verificación en caso de utilizar otros termocicladores.

Ante todo, la **especificidad analítica** se garantizará por la selección de los cebadores específicos del gen y las sondas de captura aleloespecíficas, así como por la selección de las estrictas condiciones de reacción. Los cebadores y sondas se comprobaron para identificar posibles homologías en todas las secuencias publicadas en las bases de datos genéticas mediante un análisis de comparación de secuencias. Por lo tanto, la capacidad de detección de todos los fenotipos pertinentes se ha garantizado. La reactividad cruzada potencial entre las sondas de captura se verificó mediante ADN sintético que porta el fragmento de gen respectivo. No se observó reactividad cruzada.

Funcionamiento clínico: En un estudio de comparación multicéntrico (Puehringer *et al.* 2007), se analizaron 272 muestras de pacientes obtenidas del área de captación de ocho centros de talasemia de todo el mundo mediante la prueba α-Globin StripAssay® y los métodos de referencia utilizados habitualmente en estos laboratorios. De los 544 alelos α-globina de tipo natural o mutantes de la cohorte de pacientes, los resultados de 523 (96,14 %) coincidieron por completo entre StripAssay® y los métodos internos.

IX. SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se han probado cinco sustancias interferentes (hemoglobina, inmunoglobulina G, restos de sangre, etanol y EDTA) que pueden estar presentes en preparados de ADN obtenidos de sangre con EDTA. Sus efectos sobre la PCR se evaluaron en tres muestras de ADN purificadas enriquecidas con diversas concentraciones de sustancias y se compararon con los controles correspondientes sin incluir ninguna sustancia interferente. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Una concentración final de <10 µM de hemoglobina, 0,1 µM de inmunoglobulina G, <1 % de sangre periférica, 1,25 % de etanol o 0,1 mM de EDTA en la reacción no interfirieron con el funcionamiento de StripAssay®.

X. LIMITACIONES DEL ENSAYO

α-Globin StripAssay® se ha diseñado exclusivamente para el diagnóstico de 21 mutaciones conocidas, tal como se enumeran en la sección III, que están representadas por sondas de captura aleloespecíficas en las Teststrips. No podrá detectar otras delecciones de alfa globina, mutaciones puntuales o recombinaciones que puedan estar presentes en la muestra de un paciente. En el mejor de los casos, una mutación puntual omitida que se encuentre dentro de la secuencia abarcada por una sonda de captura quizá se indique por la pérdida de la señal de tipo natural de la Teststrip cuando está presente simultáneamente con una delección de gen único o doble o bien se encuentra en estado homocigótico.

Las variantes raras o privadas con sitios de unión de cebadores y sondas, así como las conversiones de gen, pueden dar lugar a fallos de amplificación y omisión de señales en las Teststrips.

α-Globin StripAssay® no permite diferenciar entre los estados de mutación heterocigótica y homocigótica de la triplicación de genes anti-3,7 (anti-3,7/αα y anti-3,7/anti-3,7).

En presencia de delecciones de gen grandes, no detectables por el ensayo, las delecciones de gen único (-3,7 o -4,2) y las mutaciones puntuales aparecerán como homocigóticas.

α-Globin StripAssay® no se debe utilizar para diagnóstico prenatal ni genético previo a una implantación. El ensayo no se ha validado en muestras derivadas de biopsia de vellosidades coriónicas, líquido amniótico ni sangre de cordón umbilical.

α-Globin StripAssay® se ha diseñado exclusivamente para uso profesional en laboratorios.

XI. CONSIDERACIONES SOBRE CALIDAD

- Para obtener resultados fiables, se requiere un conocimiento exhaustivo tanto del procedimiento descrito en este documento, como de las técnicas de laboratorio y el equipo apropiado.
- No utilice los kits StripAssay® si se ha superado la fecha de caducidad.
- Tras abrir el envase principal, los reactivos StripAssay® serán estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta exterior del kit si se almacenan adecuadamente entre 2 °C y 8 °C.
- Use puntas de pipeta desechables estériles con filtros para evitar la contaminación microbiana y la contaminación cruzada de reactivos o muestras. No intercambie las tapas de los frascos.
- Un solo uso.

XII. SEGURIDAD

- No beba, coma, fuma ni utilice cosméticos en las áreas de trabajo designadas. Lleve bata de laboratorio y guantes desechables al manipular las muestras y los reactivos del kit. Lávese bien las manos después del procedimiento.
- Manipule las muestras como si existiera la posibilidad de transmisión de agentes infecciosos. Limpie y desinfecte por completo todos los materiales y superficies que estén en contacto con las muestras. Deseche todos los residuos asociados a las muestras clínicas en un contenedor para materiales de riesgo biológico.
- Evite el contacto de DNAT y Color Developer con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave de inmediato la zona con agua abundante. En caso de derrame, diluya con agua antes de secar.
- Cumpla todas las normativas medioambientales y de seguridad locales y federales vigentes.

XIII. ASISTENCIA TÉCNICA

Para obtener asistencia técnica:

- Póngase en contacto con el distribuidor local de ViennaLab Diagnostics (www.viennalab.com/distribution)
- Consulte los tutoriales de vídeo (www.viennalab.com/support)
- Consulte el manual de StripAssay® (www.viennalab.com/support)
- Consulte la guía de solución de problemas de StripAssay® (www.viennalab.com/support)
- Póngase en contacto con techhelp@viennalab.com













XIV. REFERENCIAS

- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man (www.omim.org)
- Base de datos 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. COMENTARIOS PARA EL FABRICANTE

Si se produce un incidente grave en relación con el ensayo StripAssay®, se deberá comunicar a la autoridad competente del país y al fabricante.

XVI. SÍMBOLOS

	N.º de catálogo
	Código de lote
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Conforme con la normativa europea sobre IVD 2017/746
	N.º de identificación del organismo notificado
	Suficiente para <n> pruebas
	Límites de temperatura de almacenamiento
	Fecha de caducidad
	Precaución
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Consulte las instrucciones de uso

XVII. EJEMPLOS DE RESULTADOS DE PRUEBA

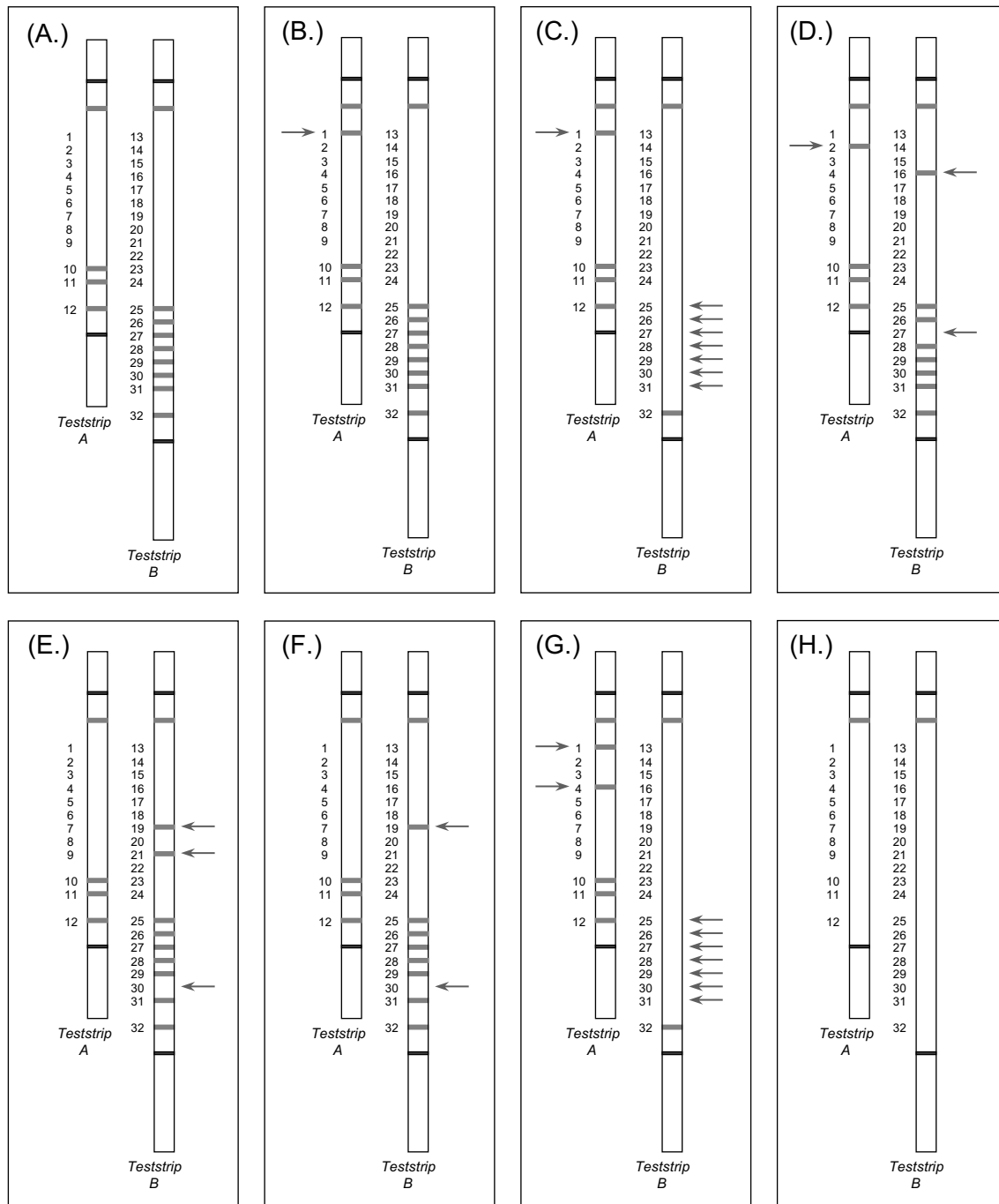



Fig. 3: Ejemplos de resultados obtenidos con α-Globin StripAssay®

- (A.) normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
- (B.) -3,7 heterocigótico (-3,7/ $\alpha\alpha$)
- (C.) -3,7 homocigótico (-3,7/-3,7)
- (D.) -4,2 + IVS1-5nt heterocigótico (-4,2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse heterocigótico (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring homocigótico (HbCS/HbCS)
- (G.) -3,7 + --MED-I heterocigótico (-3,7/--MED-I)
- (H.) Control negativo o fallo de PCR

NOTAS

XVIII. PRODUCTOS RELACIONADOS

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

Distribuidor:



Fabricante:



ViennaLab Diagnostics GmbH

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

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com