

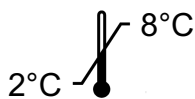
# $\alpha$ -Globin StripAssay<sup>®</sup>

Istruzioni per l'uso

**REF**



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



**IVD**



Versione: rev 1.3 / Italiano  
eIFU e altre lingue disponibili sul sito  
[www.viennalab.com](http://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](mailto:info@viennalab.com)

w: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

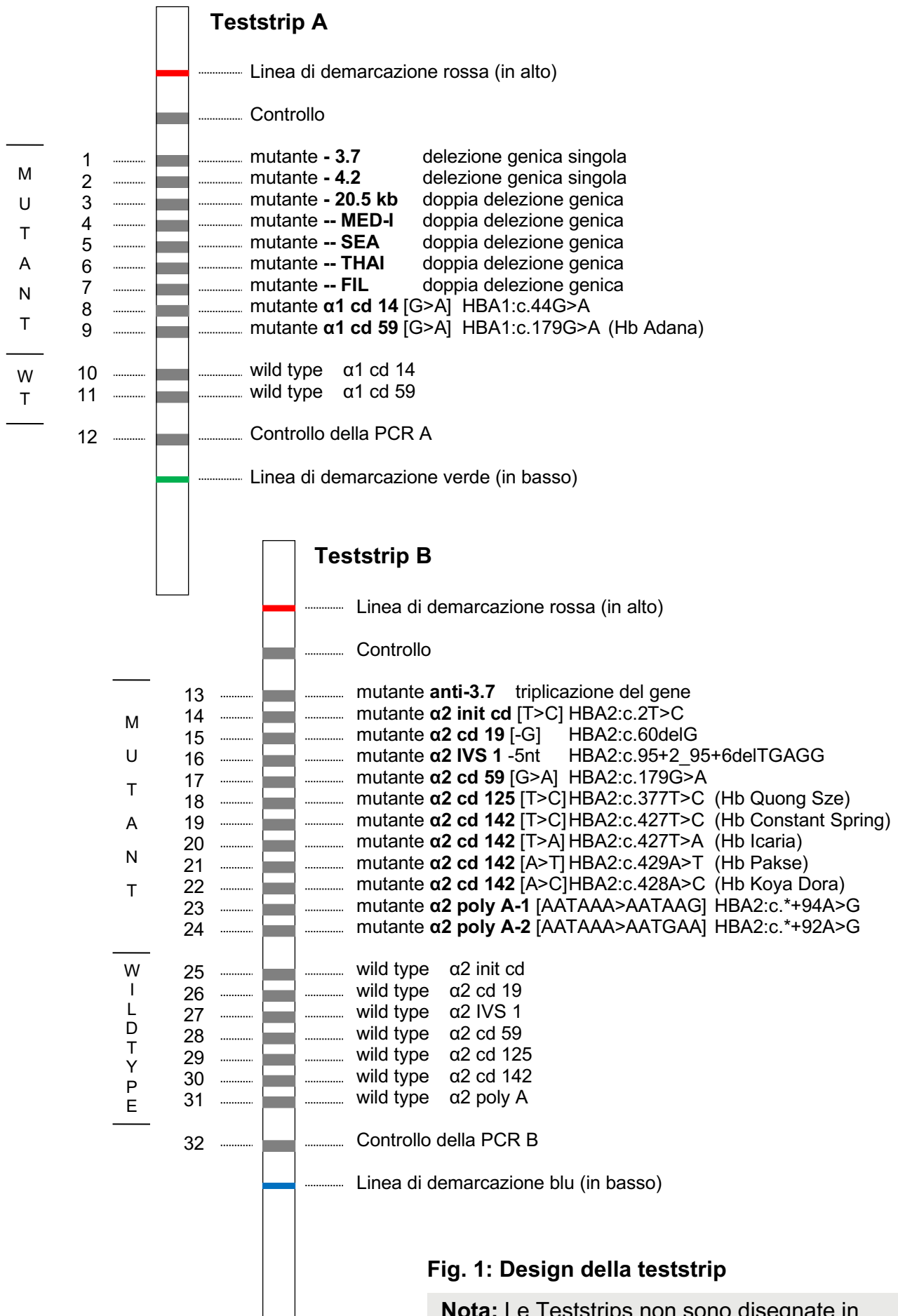
**INDICE**

I.	DESTINAZIONE D'USO .....	4
II.	BASI .....	4
III.	METODOLOGIA.....	4
IV.	COMPONENTI DEL KIT .....	6
V.	MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI.....	7
VI.	PROCEDURA DEL TEST .....	8
VII.	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI .....	12
VIII.	VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI .....	14
IX.	SOSTANZE INTERFERENTI.....	14
X.	LIMITI DEL TEST .....	15
XI.	CONSIDERAZIONI SULLA QUALITÀ.....	15
XII.	SICUREZZA .....	15
XIII.	ASSISTENZA TECNICA .....	16
XIV.	BIBLIOGRAFIA .....	16
XV.	FEEDBACK AL FABBRICANTE .....	16
XVI.	SIMBOLI.....	17
XVII.	ESEMPI DI RISULTATI DEI TEST.....	18
XVIII.	PRODOTTI CORRELATI .....	20

**CRONOLOGIA REVISIONI:**

<b>versione</b>	<b>data</b>	<b>descrizione</b>
rev 1.1	2022-02	Marchatura CE con numero di identificazione dell'organismo notificato; link alla SSP; dichiarazione sulla fonte del campione e sull'utilizzo manuale/semi-automatico (I); specifiche dei componenti del kit (IV); dati sulla prestazione clinica (VIII)
rev 1.2	2022-05	Data di pubblicazione, riferimento alle IFU elettroniche (eIFU), inclusione dell'Iran (II)
rev 1.3	2022-11	Miglioramento del layout e della risoluzione delle figure

La Sintesi relativa alla sicurezza e alla prestazione (SSP) di StripAssay® è reperibile nella Banca dati europea dei dispositivi medici (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> o presso il fabbricante.



**Fig. 1: Design della teststrip**

**Nota:** Le Teststrips non sono disegnate in dimensioni reali e non devono essere utilizzate per l'interpretazione dei risultati.

## **I. DESTINAZIONE D'USO**

α-Globin StripAssay® è un test genetico qualitativo per l'analisi mirata di 21 grandi delezioni e mutazioni puntiformi comuni dei geni di *emoglobina subunità alfa 1* (*HBA1*, *hemoglobin subunit alpha 1*) e *alfa 2* (*HBA2*, *hemoglobin subunit alpha 2*) in DNA isolato da sangue periferico umano. Il test è utilizzato come ausilio per confermare a livello genetico una presunta diagnosi di alfa-talassemia. Inoltre, è possibile utilizzare il test per lo screening dello stato di portatore di talassemia nei parenti del paziente e nella popolazione generale. È possibile eseguire StripAssay® in modo manuale o semi-automatico.

Per uso diagnostico *in vitro* sull'uomo.

## **II. BASI**

Le mutazioni nei geni di *alfa-globina* sono la causa genetica dell'alfa-talassemia, un disturbo ereditario autosomico recessivo caratterizzato da una produzione insufficiente o assente di catene di alfa-globina che determina un quadro clinico variabile a seconda del numero di alleli affetti.

Dovrebbero sottoporsi al test i pazienti con valori ematologici caratteristici dell'anemia microcitica e con i corrispondenti pattern emoglobinici, i familiari di un paziente affetto, i futuri genitori, nonché gli individui provenienti da popolazioni ad alto rischio (es. regione mediterranea, Africa, penisola arabica, Iran, India e sud-est asiatico), considerati potenziali portatori di alfa-talassemia.

## **III. METODOLOGIA**

α-Globin StripAssay® si basa sulla reazione a catena della polimerasi (PCR, polymerase chain reaction) e sull'ibridazione inversa. La procedura prevede tre fasi: (1) isolamento del DNA, (2) amplificazione PCR mediante primer biotinilati, (3) ibridazione dei prodotti di amplificazione con una Teststrip contenente sonde oligonucleotidiche specifiche per allele immobilizzate come una matrice di linee parallele (Fig. 1). Le sequenze biotinilate legate vengono rilevate con streptavidina-fosfatasi alcalina e substrati colorati.

α-Globin StripAssay® rileva le seguenti mutazioni nel locus genico della *alfa-globina*:

nome tradizionale	nomenclatura HGVS	RefSNP
1 -3.7 kb	NG_000006.1:g.34164_37967del3804	--
2 -4.2 kb	n.a.	--
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 triplicazione del gene anti-3.7	n.a.	--
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

Sequenza di riferimento (RefSeq, Reference Sequence):

NG\_000006.1



NM\_000558.3 (HBA1)

NM\_000517.4 (HBA2)

È possibile eseguire il test manualmente o in modo semi-automatico, utilizzando strumenti progettati per l'automazione della processazione delle Teststrips (vedere la sezione VI. 3.4).

**IV. COMPONENTI DEL KIT**

**REF**

	<b>4-160</b>	<b>4-160-A</b>	<b>4-160-TRIAL</b>
1a. <b>Amplification Mix A1</b> ( <i>tappo giallo</i> )	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1b. <b>Amplification Mix A2</b> ( <i>tappo bianco</i> )	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1c. <b>Amplification Mix B</b> ( <i>tappo verde</i> )	250 µl	2x 250 µl	250 µl
2. <b>Taq Dilution Buffer</b> ( <i>tappo trasparente</i> )	500 µl	500 µl	500 µl
3. <b>HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)</b> ( <i>tappo rosso</i> )	125 U	175 U	125 U
4. <b>DNAT</b> ( <i>tappo blu</i> )	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Avvertenza: DNAT contiene 1,6% NaOH                      H315: Provoca irritazione cutanea                      H319: Provoca grave irritazione oculare                      P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso                      P337 + P313: Se l'irritazione degli occhi persiste: consultare un medico</p>			
5. <b>Typing Trays</b>	3	---	2
6a. <b>Teststrips A</b> ( <i>tappo nero</i> )	10	24	5
6b. <b>Teststrips B</b> ( <i>tappo bianco</i> )	10	24	5
7. <b>Hybridization Buffer</b> ( <i>tappo bianco</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
8. <b>Wash Solution A</b> ( <i>tappo bianco</i> )	80 ml	200 ml	80 ml
9. <b>Conjugate Solution</b> ( <i>tappo trasparente</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
10. <b>Wash Solution B</b> ( <i>tappo trasparente</i> )	80 ml	200 ml	80 ml
11. <b>Color Developer</b> ( <i>tappo marrone</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Avvertenza: Color Developer contiene ≤0,4% acido maleico                      H317: Può provocare una reazione allergica cutanea                      P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso                      P302 + P352: In caso di contatto con la pelle: lavare abbondantemente con acqua                      P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico</p>			
12. <b>Istruzioni per l'uso</b>	1	1	1
13. <b>Collector™ Sheet</b>	1	3	1

**Nota:** Conservare tutti i reagenti tra 2°C e 8°C quando non vengono utilizzati.

<b>nome del componente</b>	<b>composizione</b>
Amplification Mix A1/A2/B	oligonucleotidi marcati con biotina in 5' specifici per sequenza, una miscela equimolare di deossiribonucleotidi trifosfati (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), MgCl <sub>2</sub> , tampone solfato di ammonio, betaina, 0,05% azoturo di sodio
Taq Dilution Buffer	tampone per HS-Taq DNA Polymerase, che include KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e MgCl <sub>2</sub> , 0,05% azoturo di sodio
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	hot-start-Taq DNA polymerase a una concentrazione di 5 U/µl
DNAT	soluzione basica contenente 1,6% idrossido di sodio e un colorante blu che indica una variazione di pH
Typing Trays	vassoio di plastica con otto pozzetti

<b>nome del componente</b>	<b>composizione</b>
Teststrips A/B	sonde oligonucleotidiche specifiche per allele, controllo per reazione PCR positiva e un controllo di ibridazione immobilizzato sotto forma di matrice di linee parallele su una membrana con supporto in poliestere, delimitata da una linea rossa in alto e una linea verde (Teststrip A) o blu (Teststrip B) in basso
Hybridization Buffer	tampone fosfato con <2% detergente
Wash Solution A	tampone citrato con <1% detergente
Conjugate Solution	fosfatasi alcalina coniugata con streptavidina, diluita in un tampone a base salina con 0,05% azoturo di sodio
Wash Solution B	tampone Tris contenente <2% detergente e 0,05% azoturo di sodio
Color Developer	il substrato colorato per la fosfatasi alcalina contiene blu nitrotetrazolo (NBT, nitro blue tetrazolium) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate).
Istruzioni per l'uso	carta stampata
Collector™ Sheet	carta stampata

## V. MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Oltre alle attrezzature standard dei laboratori di biologia molecolare, è necessario quanto segue:

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- Termociclatore con coperchio riscaldato (per le specifiche sulle velocità di rampa, vedere la sezione VIII)
- Bagnomaria con piattaforma per agitazione, coperchio e temperatura regolabile ( $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ )
- Agitatore (oscillante o orbitale)

### **Opzionale:**

- Apparecchio per aspirazione sotto vuoto
- Agitatore termico per piastra da microtitolazione con coperchio e temperatura regolabile ( $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), es. PST-60 HL (Biosan) o dispositivo equivalente
- Strumento per l'ibridazione automatizzata, regolabile in base al profilo tempo-temperatura come descritto nella sezione VI. 3.4, es. DYNABLOT Heat (Dynex) o dispositivo equivalente
- Apparecchiatura per elettroforesi su gel di agarosio (per il controllo dei prodotti di amplificazione)

## VI. PROCEDURA DEL TEST

### 1. Preparazione del campione

**Campione:** Utilizzare sangue fresco o congelato con anticoagulante EDTA. Il sangue contenente eparina o citrato non è stato testato. Non conservare il sangue per più di 3 giorni a temperatura ambiente o per più di 1 settimana tra 2°C e 8°C prima dell'uso. Non utilizzare sangue che è stato conservato congelato per più di un anno o che ha subito più di tre cicli di congelamento/scongelamento. Per il prelievo e il trasporto dei campioni, seguire le istruzioni per l'uso della provetta di raccolta del sangue in EDTA e le raccomandazioni generali per il campionamento del sangue.

**Estrazione del DNA:** Portare i campioni di sangue a temperatura ambiente. Mescolare accuratamente, capovolgendo più volte le provette di raccolta del sangue. Mescolare di nuovo ogni volta prima di prelevare un'aliquota di sangue. Per l'isolamento del DNA dal sangue intero si raccomanda di utilizzare lo **Spin Micro DNA Extraction Kit** (REF 2-020, ViennaLab). L'impiego di altri metodi di isolamento del DNA con  $\alpha$ -Globin StripAssay® non è stato convalidato. Se si utilizzano altri sistemi di estrazione del DNA, la concentrazione e la purezza del DNA devono rispettivamente rientrare in un intervallo compreso tra 2 e 10 ng/ $\mu$ l e un rapporto OD<sub>A260/280</sub> fra 1,7 e 2,0. Concentrazioni di DNA più elevate devono essere diluite nell'intervallo raccomandato prima dell'inserimento nella PCR.

**Nota:** Il DNA contenente inibitori di PCR e/o particelle magnetiche derivate dal sistema di estrazione a microsfere può essere refrattario all'amplificazione e deve essere diluito a 2 ng/ $\mu$ l usando acqua per PCR.

Il DNA estratto deve essere conservato tra 2°C e 8°C (fino a una settimana) o tra -30°C e -15°C (a lungo termine) fino al momento dell'analisi.

## 2. Amplificazione in vitro (PCR) – 3 reazioni separate per campione

**Importante:** Tenere sempre refrigerati tutti i reagenti per la PCR e i template di DNA.

- Preparare ogni volta una quantità adeguata di soluzione di lavoro (1:15, conc. finale 0,33 U/μl) di **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, tappo rosso) in **Taq Dilution Buffer** (tappo trasparente) per il numero di campioni da analizzare, più il **controllo di reazione negativa** (NTC, no-template control).

componente	per reazione	es. 10 reazioni
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,33 μl	3,3 μl
Taq Dilution Buffer	4,67 μl	46,7 μl
soluzione di lavoro	5 μl	50 μl

- Preparare tre provette di reazione per ogni campione da amplificare. Mettere le provette su ghiaccio.
- Per ogni campione, preparare 3 mix di reazione finali per PCR (A1, A2, B) su ghiaccio:
  - A1: **15 μl Amplification Mix A1** (tappo giallo)  
**5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluito** (1,66 U)  
**5 μl template di DNA**
  - A2: **15 μl Amplification Mix A2** (tappo bianco)  
**5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluito** (1,66 U)  
**5 μl template di DNA**
  - B: **15 μl Amplification Mix B** (tappo verde)  
**5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluito** (1,66 U)  
**5 μl template di DNA**

**Nota:** Si consiglia di preparare per tutti i campioni un Master Mix contenente Amplification Mix e HS-Taq DNA Polymerase diluito. Prima pipettare 20 μl di Master Mix in ogni provetta per PCR e poi aggiungere il template di DNA. Includere un controllo di reazione negativa in ogni analisi, utilizzando acqua per PCR al posto del DNA (o preferibilmente il controllo negativo per l'estrazione del DNA).

In linea generale, preparare soluzioni di lavoro / Master Mix con un volume in eccesso del 10% per compensare le imprecisioni del pipettaggio.

- Chiudere ermeticamente le provette. Preriscaldare il termociclatore a 95°C.
- Inserire le provette di reazione ed eseguire il seguente programma di termociclaggio:
  - pre-PCR: 95°C/5 min.**
  - termociclaggio: 97°C/40 s - 64°C/40 s - 72°C/1:30 min. (3 cicli)**  
**97°C/40 s - 58°C/40 s - 72°C/1:30 min. (37 cicli)**
  - estensione finale: 72°C/5 min.**
- Conservare i prodotti di amplificazione su ghiaccio o tra 2°C e 8°C per un utilizzo successivo.

**Opzionale:** Analizzare i prodotti di amplificazione mediante elettroforesi su gel (es. gel di agarosio al 3%).

Lunghezze dei frammenti: 881 bp; delezioni: 1783 bp (A1)  
 296 bp; delezioni: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 bp (A2)  
 302, 864 bp; delezioni: 1772 bp (A)

### 3. Processazione delle Teststrips

#### 3.1. Ibridazione (manuale) – 2 Teststrips per campione (45°C, bagnomaria in agitazione)

**Importante:** Regolare il livello dell'acqua del bagnomaria a circa ½ dell'altezza del Typing Tray. Riscaldare il bagnomaria esattamente a 45°C. Controllare la temperatura dell'acqua con un termometro calibrato. Preriscaldare Hybridization Buffer e Wash Solution A a 45°C. Accertarsi che tutti i precipitati formati tra 2°C e 8°C si dissolvano completamente. Attendere che Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B e Color Developer raggiungano la temperatura ambiente. Preparare uno o più Typing Tray.

Estrarre una Teststrip A e una Teststrip B per ogni campione usando una pinzetta pulita. Toccare le Teststrips solo con guanti senza polvere. Contrassegnare le Teststrips al di fuori delle linee di demarcazione con una matita (non penne a sfera, pennarelli, ecc.).

Per tutte le **Teststrips A** (una corsia per campione):

- Pipettare **20 µl di DNAT** (tappo blu) nell'angolo inferiore di ogni corsia da utilizzare nei Typing Trays.
- Aggiungere **10 µl di prodotto di amplificazione A1** nella goccia corrispondente di DNAT.
- Aggiungere **10 µl di prodotto di amplificazione A2** nella stessa goccia.
- Mescolare accuratamente con una pipetta (la soluzione rimarrà blu).

Per tutte le **Teststrips B** (una corsia per campione):

- Pipettare **10 µl di DNAT** (tappo blu) nell'angolo inferiore di ogni corsia da utilizzare nei Typing Trays.
- Aggiungere **10 µl di prodotto di amplificazione B** nella goccia corrispondente di DNAT.
- Mescolare accuratamente con una pipetta (la soluzione rimarrà blu).

- Lasciare riposare per **5 min.** a temperatura ambiente.
- Aggiungere **1 ml di Hybridization Buffer** (preriscaldato a 45°C) in ogni corsia. Agitare delicatamente il vassoio (il colore blu scompare).
- Inserire la **Teststrip A** o la **Teststrip B** con il lato stampato rivolto verso l'alto (linee visibili) nelle rispettive corsie. Immergere completamente.
- Incubare per **30 min.** a **45°C** sulla piattaforma per agitazione del bagnomaria.

Impostare una frequenza di agitazione moderata (circa 50 giri al minuto) per evitare fuoriuscite. Per evitare variazioni di temperatura, tenere chiuso il coperchio del bagnomaria.

- Al termine dell'incubazione, rimuovere le soluzioni di ibridazione mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.

Procedere immediatamente. Non lasciare asciugare le Teststrips per tutta la durata della procedura.

#### 3.2. Lavaggio di stringenza (45°C, bagnomaria in agitazione)

- Aggiungere **1 ml di Wash Solution A** (preriscaldato a 45°C). Risciacquare brevemente (10 s).  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution A** (45°C).
- Incubare per **15 min.** a **45°C** nel bagnomaria in agitazione.  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution A** (45°C).

- Incubare per **15 min.** a **45°C** nel bagnomaria in agitazione.  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.

### **3.3. Rilevamento colorimetrico** (temperatura ambiente, 22°C ± 3°C)

- Aggiungere **1 ml di Conjugate Solution**.
- Incubare per **15 min.** a **temperatura ambiente** su un agitatore oscillante o orbitale.  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution B**. Risciacquare brevemente (10 s).  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution B**.
- Incubare per **5 min.** a **temperatura ambiente** su un agitatore oscillante o orbitale.  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution B**.
- Incubare per **5 min.** a **temperatura ambiente** su un agitatore oscillante o orbitale.  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Color Developer**.
- Incubare per **15 min.** a **temperatura ambiente** al buio su un agitatore oscillante o orbitale.  
Una colorazione viola apparirà in seguito a reazione positiva.
- Lavare le Teststrips più volte con acqua distillata.  
Lasciare asciugare le strisce al buio su carta assorbente.

Non esporre le Teststrips a luce intensa dopo lo sviluppo del colore.

### **3.4. Ibridazione (automatizzata)** - opzionale, al posto del bagnomaria e dell'agitatore

Uno strumento per la processazione automatizzata delle Teststrips deve soddisfare i seguenti requisiti:

- Profilo con temperatura e tempo programmabili, in base alle sezioni da 3.1 a 3.3 della procedura StripAssay®.
- Stazione di preriscaldamento integrata per Hybridization Buffer e Wash Solution A.
- Controllo della temperatura dei vassoi durante le fasi di ibridazione e lavaggio di stringenza a 45°C ± 1°C.
- Sistema di raffreddamento attivo del vassoio per garantire una rapida diminuzione della temperatura per le fasi di rilevamento colorimetrico a temperatura ambiente.
- Possibilità di agitare il vassoio.
- Coperchio riscaldato per il vassoio, per evitare l'evaporazione dei reagenti durante l'incubazione.
- Erogazione di volumi definiti dei reagenti.
- Aspirazione dei reagenti.
- A seconda dello strumento utilizzato e del numero di campioni elaborati in una sessione, potrebbero essere necessari reagenti aggiuntivi. Sono disponibili StripAssay® Detection Reagents distinti per 20 test (REF CS-012) e 48 test (REF CS-017).

## VII. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

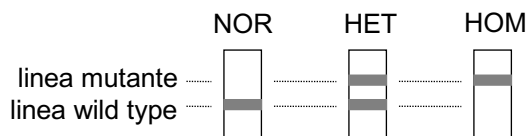
Il genotipo di un campione viene determinato dalle corrispondenti Teststrips A e B utilizzando il Collector™ Sheet accluso. Collocare entrambe le Teststrips processate nei campi designati, allinearle allo schema utilizzando la linea di demarcazione rossa (in alto) e la linea di demarcazione verde o blu (in basso) e fissarle con del nastro adesivo.

Una reazione positiva sulla linea di controllo superiore indica la corretta funzionalità di Conjugate Solution e Color Developer. Questa linea deve sempre risultare positiva.

Una reazione positiva sulle linee di controllo della PCR A e di controllo della PCR B indica la presenza dei prodotti di amplificazione corretti. Queste linee devono sempre risultare positive, tranne per il controllo di reazione negativa, che contiene acqua al posto del template di DNA (vedere esempio H a pagina 18).

L'assenza dei controlli della PCR sulle Teststrips potrebbe indicare una falsa ibridazione dei prodotti dell'Amplification Mix A1/A2 con la Teststrip B e dei prodotti dell'Amplification Mix B con la Teststrip A. Ripetere il test.

Per ogni posizione di polimorfismo, si deve ottenere uno dei seguenti pattern di colorazione (Fig. 2):



**Fig. 2: Genotipi - pattern di colorazione sulla Teststrip**

	linea wild type	linea mutante	genotipo
NOR	<b>positiva</b>	negativa	normale
HET	<b>positiva</b>	<b>positiva</b>	eterozigote
HOM	negativa	<b>positiva</b>	mutante omozigote

**Nota:** L'intensità di colorazione delle linee positive può variare, ma questo non è significativo ai fini del risultato.

**Vedere gli esempi** di risultati di StripAssay® a pagina 18 (Fig. 3).

Alcune delle mutazioni puntiformi coperte da α-Globin StripAssay® si trovano all'interno di pochi nucleotidi del gene di *α-globina*. Queste sono rappresentate sulle Teststrips da una sonda wild type comune, così le 21 mutazioni sono coperte solo da 9 sonde wild type:

linea	sonda wild type	mutazione
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

I campioni che sono eterozigoti composti per due di queste mutazioni (es. Hb Constant Spring + Hb Pakse) saranno privi del segnale wild type comune (vedere esempio E a pagina 18).

I campioni che sono eterozigoti composti per una delle mutazioni α1/α2 e una delezione genica singola o doppia, nella maggior parte dei casi saranno privi del rispettivo segnale wild type (vedere esempio D a pagina 18).

Per le delezioni geniche singole e doppie, diverse sonde wild type distinguono tra lo stato di eterozigote e di mutante omozigote (vedere gli esempi B e C a pagina 18):

delezione	eterozigote	mutante omozigote
- 3.7	tutti i segnali WT presenti	segnali WT 25-31 assenti
- 4.2	tutti i segnali WT presenti	segnali WT 25-31 assenti
- 20.5 kb	tutti i segnali WT presenti	segnali WT 10 e 25-31 assenti
-- MED-I	tutti i segnali WT presenti	tutti i segnali WT assenti
-- SEA	tutti i segnali WT presenti	tutti i segnali WT assenti
-- THAI	tutti i segnali WT presenti	tutti i segnali WT assenti
-- FIL	tutti i segnali WT presenti	tutti i segnali WT assenti

Come per qualsiasi test diagnostico, i risultati di α-Globin StripAssay® devono essere interpretati nel contesto del fenotipo clinico complessivo del paziente e di altre indagini cliniche a disposizione del medico. ViennaLab Diagnostics GmbH non è responsabile delle decisioni cliniche adottate.

## VIII. VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

L'**accuratezza** di α-Globin StripAssay® è stata determinata analizzando 330 campioni di DNA genomico precedentemente tipizzati. Fatta eccezione per un campione, i risultati concordavano con il metodo di riferimento (sequenziamento di Sanger, gap-PCR, ARMS-PCR, reverse dot-blot analysis, campioni derivati da EQA). Un campione polyA-2 eterozigote, emerso da una rara ricombinazione delle estremità 3' dei geni *alfa-2* e *pseudo-alfa*, è stato tipizzato dallo StripAssay® come falso negativo (wild type). Il test ha rilevato correttamente 359 alleli mutanti (= 99,7% percentuale di concordanza positiva) e 300 alleli wild type (= 100% percentuale di concordanza negativa).

La **precisione** di α-Globin StripAssay® è stata valutata in termini di variabilità tra le repliche, gli operatori, i giorni, i termociclatori e i dispositivi di ibridazione. Su 62 test complessivi eseguiti sulla base dei parametri studiati, 61 hanno mostrato i risultati di genotipizzazione attesi e un campione non è andato a buon fine a causa di un'imprecisione nel pipettaggio del template di DNA. Sono state riscontrate solo differenze trascurabili nell'intensità di colorazione delle Teststrips e non è stata osservata alcuna colorazione di fondo. α-Globin StripAssay® è stato convalidato su AB GeneAmp® PCR System 2700, MJ Research PTC-200 ed Eppendorf Mastercycler X50s, che presentano velocità di riscaldamento e raffreddamento rispettivamente nell'intervallo da 1,7 a 6,3°C/s e da 1,4 a 3,7°C/s.

L'utilizzo di altri termociclatori deve essere verificato dall'utente.

La **specificità analitica** è garantita innanzitutto dalla selezione dei primer specifici per il gene e delle sonde di cattura specifiche per allele, nonché dalla selezione di condizioni di reazione stringenti. I primer e le sonde sono stati controllati per verificare possibili omologie con tutte le sequenze pubblicate nei database genetici, mediante l'analisi di confronto delle sequenze. In questo modo, è stata assicurata la rivelabilità di tutti i genotipi pertinenti. La potenziale reattività crociata tra le sonde di cattura è stata verificata con DNA sintetico recante il rispettivo frammento genico. Non è stata osservata reattività crociata.

**Prestazione clinica:** In uno studio comparativo multicentrico (Puehringer et al. 2007), sono stati analizzati con α-Globin StripAssay® e con i metodi di riferimento usati abitualmente in questi laboratori 272 campioni di pazienti provenienti dal bacino di utenza di otto diversi centri per la talassemia in tutto il mondo. Su 544 alleli di α-globina wild type o mutanti presenti nella coorte di pazienti, per 523 (96,14%) i risultati concordavano completamente tra StripAssay® e metodi interni.

## IX. SOSTANZE INTERFERENTI

Sono state testate cinque sostanze interferenti (emoglobina, immunoglobulina G, tracce di sangue, etanolo ed EDTA) potenzialmente presenti nelle preparazioni di DNA derivate da sangue in EDTA. I loro effetti sulla PCR sono stati valutati in tre campioni di DNA purificato con diverse concentrazioni di sostanze e confrontati con i relativi controlli senza aggiunta di sostanze interferenti. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato.

Una concentrazione finale di emoglobina <10 µM, immunoglobulina G 0,1 µM, sangue periferico <1%, etanolo 1,25% o EDTA 0,1 mM nella reazione non ha interferito con le prestazioni di StripAssay®.

## **X. LIMITI DEL TEST**

α-Globin StripAssay® è concepito esclusivamente per la diagnosi di 21 mutazioni note, elencate nella sezione III, rappresentate dalle sonde di cattura specifiche per allele che si trovano sulle Teststrips. Non è possibile rilevare altre delezioni, mutazioni puntiformi, ricombinazioni di alfa-globina che potrebbero essere presenti nel campione di un paziente. Al massimo, una mutazione puntiforme non considerata e situata all'interno della sequenza coperta da una sonda di cattura può essere indicata dalla perdita del segnale wild type sulla Teststrip quando è presente contestualmente a una delezione genica singola o doppia o nello stato omozigote.

Varianti rare o private all'interno dei siti di legame dei primer e delle sonde, così come conversioni geniche, possono determinare l'insuccesso dell'amplificazione e la mancanza di segnali sulle Teststrips.

α-Globin StripAssay® non consente di distinguere tra lo stato di eterozigote e di mutante omozigote della triplicazione del gene anti-3.7 (anti-3.7/α e anti-3.7/anti-3.7).

In presenza di grandi delezioni geniche non rilevabili dal test, le delezioni geniche singole (-3.7 o -4.2) e le mutazioni puntiformi appaiono come omozigoti.

α-Globin StripAssay® non deve essere utilizzato per la diagnosi prenatale o la diagnosi genetica preimpianto. Il test non è stato convalidato su campioni derivati dal prelievo di villi coriali, dal liquido amniotico o dal sangue del cordone ombelicale.

α-Globin StripAssay® è destinato esclusivamente all'uso professionale in laboratorio.

## **XI. CONSIDERAZIONI SULLA QUALITÀ**

- Per ottenere risultati affidabili, è necessaria una conoscenza approfondita della procedura qui descritta, nonché delle tecniche di laboratorio standard e delle attrezzature adeguate.
- Non utilizzare i kit StripAssay® oltre la data di scadenza.
- Dopo la prima apertura del contenitore primario, i reagenti di StripAssay® sono stabili fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta esterna del kit, se correttamente conservati tra 2°C e 8°C.
- Utilizzare puntali per pipette sterili monouso con filtri per evitare la contaminazione microbica e la contaminazione crociata dei reagenti o dei campioni. Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Solo per uso singolo.

## **XII. SICUREZZA**

- Non bere, mangiare, fumare o usare cosmetici nelle aree di lavoro designate. Durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit, indossare camici da laboratorio e guanti monouso. Successivamente, lavarsi accuratamente le mani.
- Maneggiare i campioni come potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi. Pulire e disinfettare accuratamente tutti i materiali e le superfici che sono stati a contatto con i campioni. Smaltire tutti i rifiuti associati ai campioni clinici in un contenitore per rifiuti a rischio biologico.
- Evitare che DNAT e Color Developer entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua. In caso di versamento, diluire con acqua prima di asciugare.
- Attenersi alle normative locali e nazionali vigenti in materia di sicurezza e ambiente.

### **XIII. ASSISTENZA TECNICA**

È possibile ottenere assistenza tecnica tramite:

- il distributore locale di ViennaLab Diagnostics ([www.viennalab.com/distribution](http://www.viennalab.com/distribution))
- i Video Tutorial ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- il manuale di StripAssay® ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- la Troubleshooting Guide di StripAssay® ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- rivolgendosi a [techhelp@viennalab.com](mailto:techhelp@viennalab.com)












### **XIV. BIBLIOGRAFIA**

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

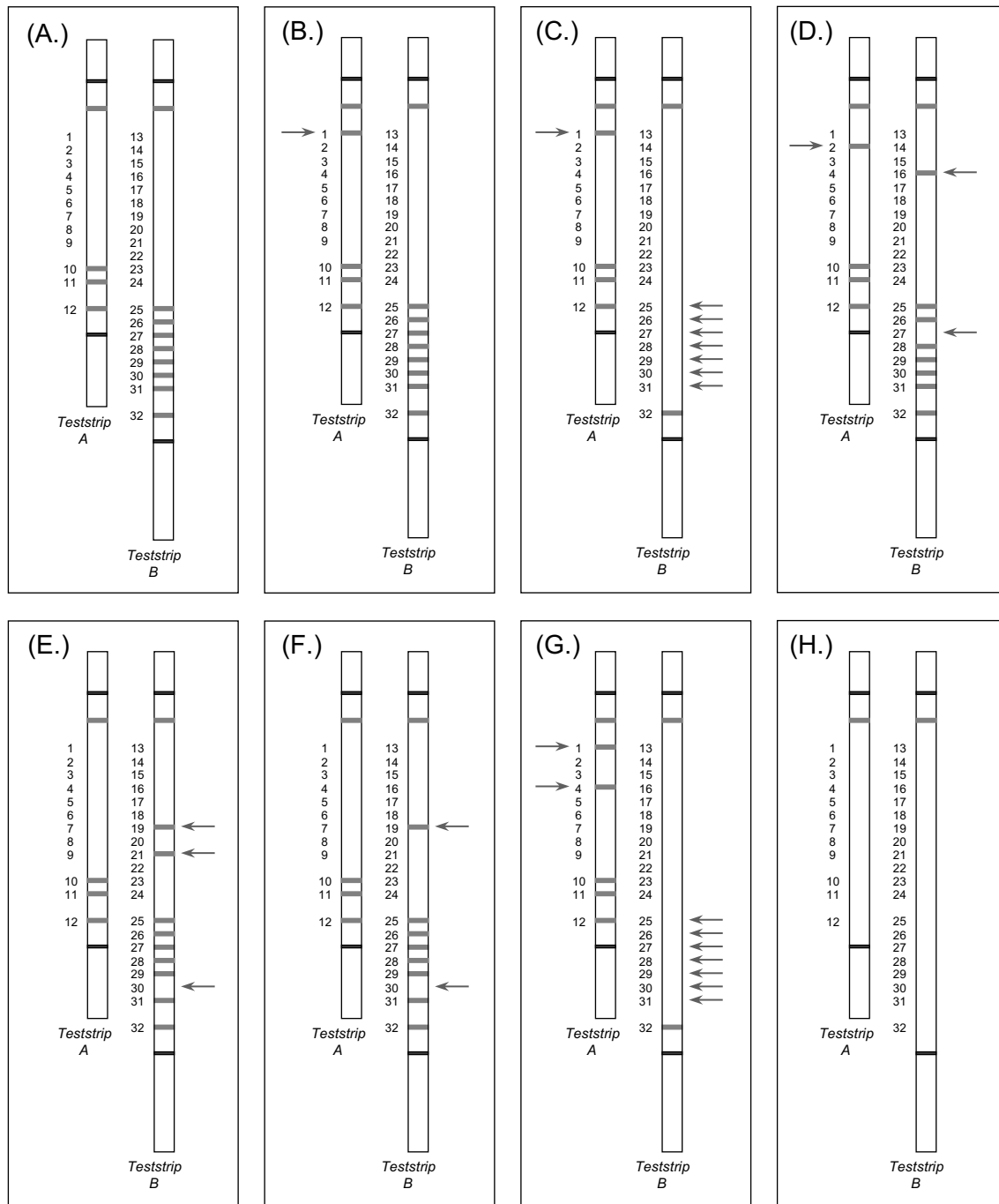
### **XV. FEEDBACK AL FABBRICANTE**

Eventuali incidenti gravi verificatisi in relazione a StripAssay® devono essere segnalati all'autorità competente del Paese e al fabbricante.

**XVI. SIMBOLI**

	Numero di catalogo
	Codice lotto
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Conforme al Regolamento europeo 2017/746 sugli IVD
0123	Numero di identificazione dell'organismo notificato
	Sufficiente per <n> test
	Limiti di temperatura per la conservazione
	Data di scadenza
	Attenzione
	Fabbricante
	Data di fabbricazione
	Consultare le istruzioni per l'uso

**XVII. ESEMPI DI RISULTATI DEI TEST**




**Fig. 3: Esempi di risultati ottenuti con α-Globin StripAssay®**

- (A.) normale ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ )
- (B.) -3.7 eterozigote (-3.7/ $\alpha\alpha$ )
- (C.) -3.7 omozigote (-3.7/-3.7)
- (D.) -4.2 + IVS1-5nt eterozigote (-4.2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse eterozigote (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring omozigote (HbCS/HbCS)
- (G.) -3.7 + --MED-I eterozigote (-3.7/--MED-I)
- (H.) controllo negativo o PCR non riuscita

**NOTE**

## XVIII. PRODOTTI CORRELATI

<b>REF</b>		
4-125	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> AZE1	20 test
4-126	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> AZE2	20 test
4-130	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> MED	20 test
4-140	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> IME	20 test
4-150	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> SEA	20 test
4-160	$\alpha$ -Globin StripAssay <sup>®</sup>	10 test
4-170	$\beta$ -Thal Modifier StripAssay <sup>®</sup>	20 test
CS-012	StripAssay <sup>®</sup> Detection Reagents	20 test
CS-017	StripAssay <sup>®</sup> Detection Reagents 48	48 test
2-014	GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System	100 estrazioni
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 estrazioni
6-080	Typing Trays	5

**Distributore:**



**Fabbricante:**



**ViennaLab Diagnostics GmbH**

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

t: +43 1 8120156-0

e: [info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

w: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)