

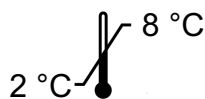
# $\alpha$ -Globin StripAssay<sup>®</sup>

Instruções de utilização

**REF**



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



**IVD**



Versão: rev 1.3/Português  
IFU em formato eletrónico e outros  
idiomas disponíveis em  
[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)

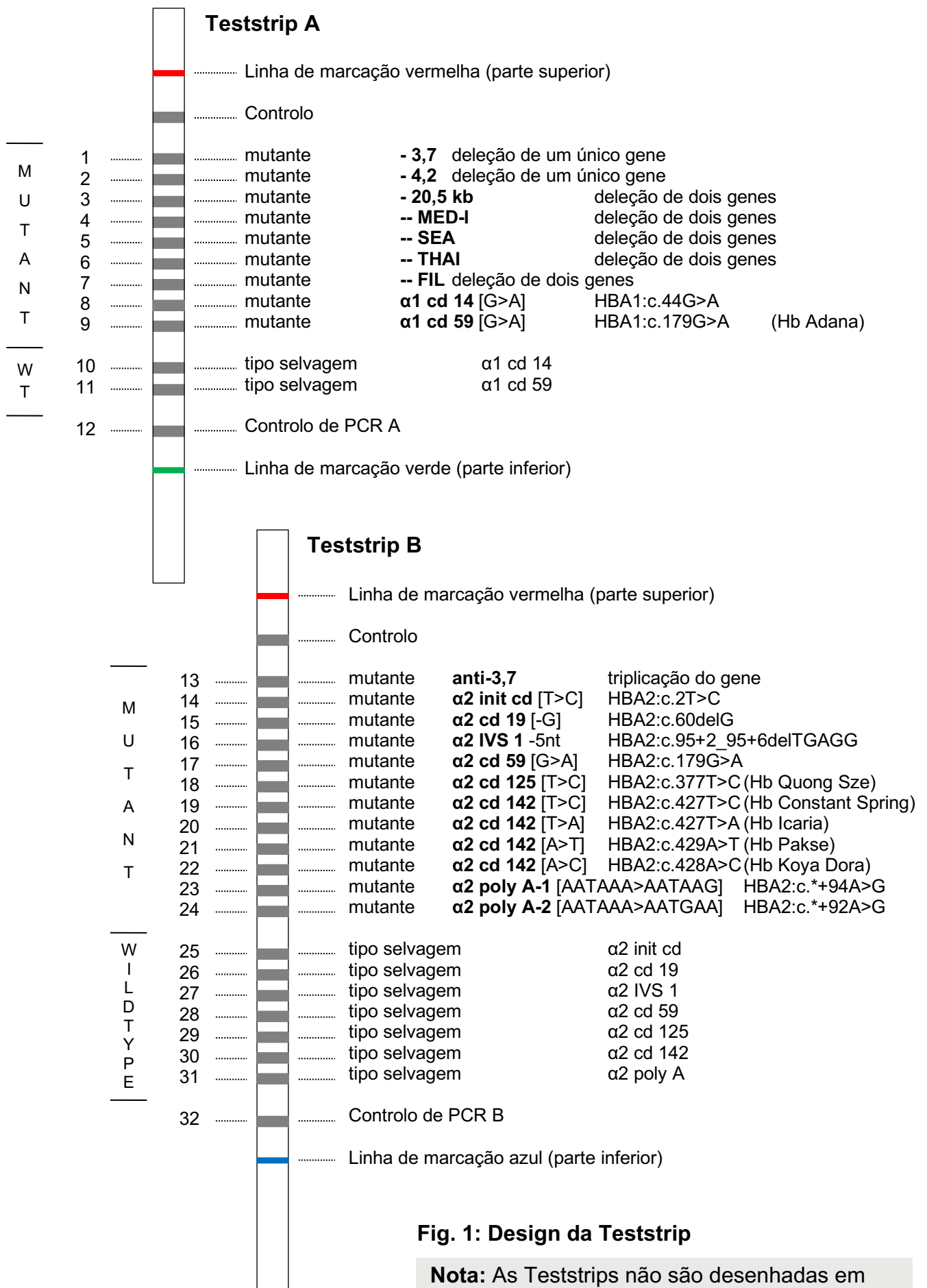
**ÍNDICE**

I.	INTENDED PURPOSE .....	4
II.	BACKGROUND.....	4
III.	METHODOLOGY .....	4
IV.	KIT COMPONENTS .....	6
V.	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED .....	7
VI.	ASSAY PROCEDURE .....	8
VII.	INTERPRETATION OF RESULTS .....	13
VIII.	PERFORMANCE EVALUATION.....	15
IX.	INTERFERING SUBSTANCES.....	15
X.	LIMITATIONS OF THE ASSAY.....	16
XI.	QUALITY CONSIDERATIONS.....	16
XII.	SAFETY .....	16
XIII.	TECHNICAL SUPPORT.....	17
XIV.	REFERENCES .....	17
XV.	FEEDBACK TO THE MANUFACTURER.....	17
XVI.	SYMBOLS .....	18
XVII.	EXAMPLES OF TEST RESULTS .....	19
XVIII.	RELATED PRODUCTS.....	21

**HISTÓRICO DE REVISÕES:**

<b>versão</b>	<b>data</b>	<b>descrição</b>
rev 1.1	2022-02	Marca CE com número de identificação do organismo notificado; ligação para o SSP; declaração da fonte da amostra e utilização manual/semi-automatizada (I); especificação dos componentes do kit (IV); dados do desempenho clínico (VIII)
rev 1.2	2022-05	Data de emissão, referência às IFU eletrónicas (eIFU), Irão (II) incluído
rev 1.3	2022-11	Disposição melhorada e resolução das figuras

O Resumo de Segurança e Desempenho (SSP, Summary of Safety and Performance) do StripAssay® pode ser encontrado na Base de Dados Europeia sobre Dispositivos Médicos (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> ou junto do fabricante.



**Fig. 1: Design da Teststrip**

**Nota:** As Teststrips não são desenhadas em tamanho real e não devem ser utilizadas para a interpretação dos resultados!

### **I. FINALIDADE PREVISTA**

O  $\alpha$ -Globin StripAssay® é um teste genético qualitativo para a análise direcionada de 21 grandes deleções e mutações pontuais comuns dos genes da *subunidade alfa 1 da hemoglobina (HBA1, hemoglobin subunit alpha 1)* e *alfa 2 (HBA2, hemoglobin subunit alpha 2)* em ADN isolado de sangue periférico humano. O teste é utilizado como um auxílio para confirmar geneticamente uma suspeita de diagnóstico de alfa-talassemia (alfa-tal). Além disso, o ensaio pode ser utilizado para o rastreio do estado de portador de talassemia nos familiares do doente e na população em geral. O StripAssay® pode ser realizado manualmente ou de forma semi-automatizada.

Para utilização em diagnóstico *in vitro* em seres humanos.

### **II. ENQUADRAMENTO**

As mutações nos genes de *alfa-globina* são a causa genética da alfa-talassemia, uma doença hereditária autossômica recessiva, que se caracteriza por uma produção insuficiente ou ausência de cadeias de alfa-globina, levando a um quadro clínico variável, dependendo do número de alelos afetados.

Devem ser testados os doentes com valores hematológicos característicos de anemia microcítica e padrões de hemoglobina correspondentes, os familiares de um doente afetado, futuros pais, bem como indivíduos de populações de alto risco (por exemplo, região do Mediterrâneo, África, Península Arábica, Irão, Índia e Sudeste Asiático), que correm o risco de serem portadores de alfa-talassemia.

### **III. METODOLOGIA**

O  $\alpha$ -Globin StripAssay® baseia-se na reação em cadeia da polimerase (PCR, polymerase chain reaction) e na hibridização reversa. O procedimento inclui três etapas: (1) isolamento do ADN, (2) amplificação por PCR utilizando iniciadores biotinilados, (3) hibridização de produtos de amplificação numa Teststrip contendo sondas de oligonucleótidos específicos do alelo, imobilizadas como um conjunto de linhas paralelas (Fig. 1). As sequências biotiniladas ligadas são detetadas utilizando fosfatase alcalina-estreptavidina e substratos de cor.

O α-Globin StripAssay® deteta as seguintes mutações no locus do gene *alfa-globina*:

nome do legado	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 anti-3,7 triplicação do gene	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

Sequência de Referência (RefSeq, Reference Sequence):

NG\_000006.1



NM\_000558.3 (HBA1)

NM\_000517.4 (HBA2)

O teste pode ser realizado manualmente ou de forma semi-automatizada utilizando instrumentos concebidos para a automação do processamento de Teststrip (consulte a secção VI. 3.4).

**IV. COMPONENTES DO KIT**

**REF**

	<b>4-160</b>	<b>4-160-A</b>	<b>4-160 -TRIAL</b>
1a. <b>Amplification Mix A1</b> ( <i>tampa amarela</i> )	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1b. <b>Amplification Mix A2</b> ( <i>tampa branca</i> )	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1c. <b>Amplification Mix B</b> ( <i>tampa verde</i> )	250 µl	2x 250 µl	250 µl
2. <b>Taq Dilution Buffer</b> ( <i>tampa transparente</i> )	500 µl	500 µl	500 µl
3. <b>HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)</b> ( <i>tampa vermelha</i> )	125 U	175 U	125 U
4. <b>DNAT</b> ( <i>tampa azul</i> )	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> <b>Aviso:</b> DNAT contém 1,6 % de NaOH                      H315: Provoca irritação cutânea.                      H319: Provoca irritação ocular grave                      P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial                      P337 + P313: Caso a irritação ocular persista: consulte um médico</p>			
5. <b>Typing Trays</b>	3	---	2
6a. <b>Teststrips A</b> ( <i>tampa preta</i> )	10	24	5
6b. <b>Teststrips B</b> ( <i>tampa branca</i> )	10	24	5
7. <b>Hybridization Buffer</b> ( <i>tampa branca</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
8. <b>Wash Solution A</b> ( <i>tampa branca</i> )	80 ml	200 ml	80 ml
9. <b>Conjugate Solution</b> ( <i>tampa transparente</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
10. <b>Wash Solution B</b> ( <i>tampa transparente</i> )	80 ml	200 ml	80 ml
11. <b>Color Developer</b> ( <i>tampa castanha</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
<p> <b>Aviso:</b> O Color Developer contém ≤0,4% de ácido maleico                      H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea                      P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial                      P302 + P352: Se entrar em contacto com a pele: lavar abundantemente com água                      P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico</p>			
12. <b>Instruções de utilização</b>	1	1	1
13. <b>Collector™ Sheet</b>	1	3	1

**Nota:** Conserve todos os reagentes de 2 °C a 8 °C quando não estiverem a ser utilizados!

<b>nome do componente</b>	<b>composição</b>
Amplification Mix A1/A2/B	oligonucleótidos marcados com 5'-biotina específicos da sequência, uma mistura equimolar de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), MgCl <sub>2</sub> , tampão de sulfato de amónio, betaina, 0,05% de azida de sódio
Taq Dilution Buffer	tampão para HS-Taq DNA Polymerase, incluindo KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e MgCl <sub>2</sub> , 0,05% de azida de sódio
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	hot-start-Taq DNA polymerase a uma concentração de 5U/µl
DNAT	solução básica contendo 1,6 % de hidróxido de sódio e um corante azul que indica uma mudança de pH
Typing Trays	bandeja de plástico com oito poços

<b>nome do componente</b>	<b>composição</b>
Teststrips A/B	sondas de oligonucleótidos específicos do alelo, controlo de reação de PCR positiva e um controlo de hibridização imobilizado como um conjunto de linhas paralelas numa membrana suportada por poliéster, com uma linha vermelha na parte superior e uma linha verde (Teststrip A) ou azul (Teststrip B) na parte inferior
Hybridization Buffer	tampão de fosfato com <2% de detergente
Wash Solution A	tampão de citrato com <1% de detergente
Conjugate Solution	estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina diluída num tampão de base salina com 0,05% de azida de sódio
Wash Solution B	tampão de tris contendo <2% de detergente e 0,05% de azida de sódio
Color Developer	substrato de cor para a fosfatase alcalina contém azul de nitrotetrazólio (NBT, nitro blue tetrazolium) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
Instruções de utilização	papel impresso
Collector™ Sheet	papel impresso

## V. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Além do equipamento padrão de laboratório de biologia molecular, são necessários os seguintes itens:

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- Termociclador com tampa aquecida (para especificações das taxas de rampa, consulte a secção VIII)
- Banho de água com plataforma de agitação, tampa e temperatura ajustável ( $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ )
- Agitador (agitador oscilante ou orbital)

### **Opcional:**

- Aparelho de aspiração a vácuo
- Termoagitador para formato de placa de microtitulação com tampa e temperatura ajustável ( $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ), por exemplo, PST-60 HL (Biosan) ou dispositivo equivalente
- Instrumento para hibridização automatizada, ajustável ao perfil de tempo-temperatura descrito na secção VI. 3.4, por exemplo, DYNABLOT Heat (Dynex) ou dispositivo equivalente
- Equipamento de eletroforese em gel de agarose (para controlo dos produtos de amplificação)

## VI. PROCEDIMENTO DE ENSAIO

### 1. Preparação da amostra

**Amostra:** Utilize sangue fresco ou congelado com anticoagulante EDTA. Sangue contendo heparina ou citrato não foi testado. Não conserve o sangue durante mais de 3 dias à temperatura ambiente ou durante mais de 1 semana a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C antes da utilização. Não utilize sangue que tenha sido mantido congelado durante mais de um ano ou que tenha passado por mais de três ciclos de congelação/descongelação. Para a colheita e o transporte de amostras, siga as instruções de utilização do tubo de recolha de sangue com EDTA e as recomendações gerais para a colheita de amostras de sangue.

**Extração de ADN:** Deixe as amostras de sangue estabilizar à temperatura ambiente. Misture bem, invertendo cuidadosamente os tubos de recolha de sangue várias vezes. Repita a mistura sempre antes de retirar uma alíquota de sangue. Recomenda-se a utilização do **Spin Micro DNA Extraction Kit** (REF 2-020, ViennaLab) para o isolamento de ADN do sangue total. A utilização de outros métodos de isolamento de ADN com  $\alpha$ -Globin StripAssay® não foi validada. No caso de serem utilizados outros sistemas de extração de ADN, a concentração e a pureza do ADN devem situar-se num intervalo de 2 a 10 ng/ $\mu$ l e um rácio de OD<sub>A260/280</sub> de 1,7 a 2,0, respetivamente. Concentrações de ADN mais elevadas têm de ser diluídas ao intervalo recomendado antes da introdução na PCR.

**Nota:** O ADN que contém inibidores da PCR e/ou partículas magnéticas derivadas do sistema de extração baseado em esferas pode ser refratário à amplificação e deve ser diluído em 2 ng/ $\mu$ l utilizando água de grau PCR.

O ADN extraído deve ser armazenado entre 2 °C e 8°C (até uma semana) ou entre -30 °C e -15 °C (a longo prazo) até ser analisado.



**2. Amplificação in Vitro (PCR) – 3 reações separadas por amostra**

**Importante:** Mantenha todos os reagentes da PCR e os modelos de ADN refrigerados ao longo do procedimento.

- Prepare sempre novamente uma quantidade apropriada de solução de trabalho (1:15, conc. final de 0,33 U/μl) de **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, tampa vermelha) em **Taq Dilution Buffer** (tampa transparente) para o número de amostras a analisar, além do **controlo sem modelo** (NTC, no-template control).

<b>componente</b>	<b>por reação</b>	<b>por exemplo, 10 reações</b>
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,33 μl	3,3 μl
Taq Dilution Buffer	4,67 μl	46,7 μl
solução de trabalho	5 μl	50 μl

- Prepare três tubos de reação para cada amostra a ser amplificada. Coloque os tubos no gelo.
- Prepare 3 misturas finais de reação de PCR (A1, A2, B) em gelo para cada amostra:
  - A1: **15 μl Amplification Mix A1** (tampa amarela)  
**5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluída** (1,66 U)  
**5 μl modelo de ADN**
  - A2: **15 μl Amplification Mix A2** (tampa branca)  
**5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluída** (1,66 U)  
**5 μl modelo de ADN**
  - B: **15 μl Amplification Mix B** (tampa verde)  
**5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluída** (1,66 U)  
**5 μl modelo de ADN**

**Nota:** Recomenda-se preparar uma Master Mix para todas as amostras contendo Amplification Mix e HS-Taq DNA Polymerase diluída. Primeiro, pipete 20 μl da Master Mix para cada tubo de PCR e, em seguida, adicione o modelo de ADN. Inclua um controlo sem modelo em cada execução, utilizando água de grau PCR em vez de DNA (ou, preferencialmente, o controlo negativo da sua extração de ADN).

Em geral, prepare soluções de trabalho/Master Mix com 10% de volume excedente para compensar imprecisões de pipetagem.

- Feche bem os tubos. Pré-aqueça o termociclador a 95 °C.
- Insira os tubos de reação e execute o seguinte programa de termociclagem:
  - pré-PCR: 95 °C/5 min.**
  - termociclagem: 97°C/40 seg. - 64°C/40 seg. - 72 °C/1:30 min. (3 ciclos)**  
**97°C/40 seg. - 58°C/40 seg. - 72 °C/1:30 min. (37 ciclos)**
  - extensão final: 72°C/5 min.**
- Conserve os produtos de amplificação no gelo ou a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C para utilização posterior.

**Opcional:** Analise os produtos de amplificação por eletroforese em gel (por exemplo, gel de agarose a 3%).

Comprimentos dos fragmentos: 881 bp; deleções: 1783 bp (A1)  
 296 bp; deleções: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 bp (A2)  
 302, 864 bp; deleções: 1772 bp (B)

### 3. Processamento das Teststrips

#### 3.1. Hibridação (manual) – 2 Teststrips por amostra (45 °C, banho de água com agitação)

**Importante:** Ajuste o nível de água do banho para aproximadamente metade da altura do Typing Tray. Aqueça o banho de água a exatamente 45 °C. Verifique a temperatura da água com um termómetro calibrado. Pré-aqueça o Hybridization Buffer e a Wash Solution A a 45 °C. Certifique-se de que todos os precipitados formados a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C se dissolvem completamente. Permita que as Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B e Color Developer alcancem a temperatura ambiente. Prepare o(s) Typing Tray(s).

Retire uma Teststrip A e uma Teststrip B para cada amostra utilizando uma pinça limpa. Manuseie as Teststrips apenas com luvas sem talco! Rotule as Teststrips fora das linhas de marcadores com um lápis (não utilize esferográficas, marcadores, etc.).

Para todas as **Teststrips A** (uma pista por amostra):

- Pipete **20 µl de DNAT** (tampa azul) no canto inferior de cada pista a ser usada nos Typing Trays.
- Adicione **10 µl de produto de amplificação A1** à gota correspondente de DNAT.
- Adicione **10 µl de produto de amplificação A2** à mesma gota.
- Misture bem com uma pipeta.  
(A solução deverá permanecer azul.)

Para todas as **Teststrips B** (uma pista por amostra):

- Pipete **10 µl de DNAT** (tampa azul) no canto inferior de cada pista a ser usada nos Typing Trays.
- Adicione **10 µl de produto de amplificação B** à gota correspondente de DNAT.
- Misture bem com uma pipeta.  
(A solução deverá permanecer azul.)

- Deixe estabilizar durante **5 minutos** à temperatura ambiente.
- Adicione **1 ml de Hybridization Buffer** (pré-aquecido a 45 °C) a cada pista. Agite suavemente o tabuleiro. (A cor azul irá desaparecer.)
- Insira a **Teststrip A** ou **Teststrip B** com o lado marcado para cima (linhas visíveis!) nas respetivas pistas. Submerja completamente.
- Incube durante **30 minutos a 45 °C** na plataforma de agitação do banho de água.

Defina uma frequência de agitação moderada (aproximadamente 50 rpm) para evitar derramamentos. Mantenha a tampa do banho de água fechada para evitar variações de temperatura.

- No final da incubação, remova as soluções de hibridação por aspiração de vácuo ou pipetagem.

Prossiga imediatamente. Não permita que as Teststrips sequem durante todo o procedimento.

**3.2. Lavagem de estrigência** (45 °C, banho de água com agitação)

- Adicione **1 ml de Wash Solution A** (pré-aquecida a 45 °C). Enxagúe brevemente (10 seg.).  
Remova os líquidos por aspiração de vácuo ou pipetagem.
- Adicione **1 ml de Wash Solution A** (a 45 °C).
- Incube durante **15 minutos a 45 °C** em banho de água com agitação.  
Remova os líquidos por aspiração de vácuo ou pipetagem.
- Adicione **1 ml de Wash Solution A** (a 45 °C).
- Incube durante **15 minutos a 45 °C** em banho de água com agitação.  
Remova os líquidos por aspiração de vácuo ou pipetagem.

**3.3. Detecção Colorimétrica** (temperatura ambiente, 22 °C ± 3 °C)

- Adicione **1 ml de Conjugate Solution**.
- Incube durante **15 minutos à temperatura ambiente** num agitador oscilante ou orbital.  
Remova os líquidos por aspiração de vácuo ou pipetagem.
- Adicione **1 ml de Wash Solution B**. Enxagúe brevemente (10 seg.).  
Remova os líquidos por aspiração de vácuo ou pipetagem.
- Adicione **1 ml de Wash Solution B**.
- Incube durante **5 minutos à temperatura ambiente** num agitador oscilante ou orbital.  
Remova os líquidos por aspiração de vácuo ou pipetagem.
- Adicione **1 ml de Wash Solution B**.
- Incube durante **5 minutos à temperatura ambiente** num agitador oscilante ou orbital.  
Remova os líquidos por aspiração de vácuo ou pipetagem.
- Adicione **1 ml de Color Developer**.
- Incube durante **15 minutos à temperatura ambiente no escuro** num agitador oscilante ou orbital.  
Aparecerá uma coloração roxa em caso de reação positiva.
- Lave as Teststrips várias vezes com água destilada.  
Deixe as tiras secar no escuro sobre papel absorvente.

Não exponha as Teststrips a luz intensa após o Color Development.

### **3.4. Hibridação (automatizada) - opcional em vez de banho de água e agitador**

Um instrumento para o processamento automatizado de Teststrips deve satisfazer os seguintes requisitos:

- Perfil de temperatura e tempo programável de acordo com a secção 3.1 a 3.3 do procedimento do StripAssay®.
- Estação de pré-aquecimento integrada para o Hybridization Buffer e a Wash Solution A.
- Controlo de temperatura das bandejas durante as etapas de Hibridização e Lavagem de estrigência a  $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .
- Sistema de arrefecimento ativo para a bandeja para garantir uma diminuição rápida da temperatura para as etapas de Detecção Colorimétrica à temperatura ambiente.
- Capacidade de agitação da bandeja.
- Tampa aquecida para a bandeja para evitar a evaporação dos reagentes durante a incubação.
- Dispensa de volumes de reagentes definidos.
- Aspiração de reagentes.
- Dependendo do instrumento utilizado e do número de amostras processadas numa única execução, podem ser necessários reagentes adicionais. Estão disponíveis StripAssay® Detection Reagents separados para 20 testes (REF CS-012) e 48 testes (REF CS-017).

## VII. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

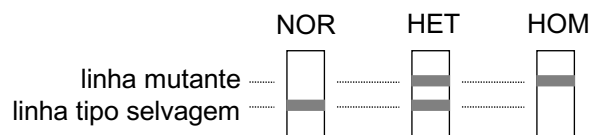
O genótipo de uma amostra é determinado a partir das Teststrips A e B correspondentes utilizando a Collector™ Sheet anexa. Coloque ambas as Teststrips processadas nos campos designados, alinhe-as com o desenho esquemático utilizando a linha de marcação vermelha (superior) e a linha de marcação verde ou azul (inferior) e fixe-as com fita adesiva.

Uma reação positiva da linha de Controlo mais acima indica o funcionamento correto da Conjugate Solution e do Color Developer. Esta linha deve adquirir sempre uma coloração positiva.

Uma reação positiva das linhas de Controlo de PCR A e B indica a presença dos produtos de amplificação corretos. Estas linhas devem ser sempre positivas, exceto no controlo sem modelo, que contém água em vez de modelo de ADN (veja exemplo H, página 19).

A ausência de Controlos de PCR nas Teststrips pode indicar uma hibridação falsa dos produtos de amplificação Mix A1/A2 na Teststrip B e dos produtos de amplificação Mix B na Teststrip A. Repita o teste.

Para cada posição polimórfica, deve ser obtido um dos seguintes padrões de coloração (Fig. 2):



**Fig. 2: Genótipos – padrões de coloração na Teststrip**

	linha tipo selvagem	linha mutante	genótipo
NOR	<b>positivo</b>	negativo	normal
HET	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	heterozigótico
HOM	negativo	<b>positivo</b>	homozigótico mutante

**Nota:** As intensidades de coloração das linhas positivas podem variar. Isto não tem qualquer significado para o resultado.

**Veja exemplos** de resultados do StripAssay® na página 19 (Fig. 3).

Algumas das mutações pontuais abrangidas pelo α-Globin StripAssay® estão localizadas em poucos nucleótidos do gene *α-globina*. Nas Teststrips, estas são representadas por uma sonda comum de tipo selvagem, de modo que as 21 mutações sejam abrangidas apenas por 9 sondas de tipo selvagem:

linha	sonda de tipo selvagem	mutação
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 Dora
31	α2 poly A	α2 poly A-1, α2 poly A-2

As amostras que são heterozigóticas compostas para duas destas mutações (por exemplo, Hb Constant Spring + Hb Pakse) não terão o sinal comum de tipo selvagem (veja exemplo E, página 19).

As amostras que são heterozigóticas compostas para uma das mutações α1/α2 e uma deleção de gene único ou duplo, na maioria dos casos, não terão o respetivo sinal de tipo selvagem (veja exemplo D, página 19).

Para as deleções de genes únicos e duplos, várias sondas de tipo selvagem discriminam entre o estado mutante heterozigótico e o estado mutante homozigótico (veja exemplos B e C, página 19):

deleção	heterozigótico	homozigótico mutante
- 3,7	todos os sinais WT presentes	sinais WT 25-31 ausentes
- 4,2	todos os sinais WT presentes	sinais WT 25-31 ausentes
- 20,5 kb	todos os sinais WT presentes	sinais WT 10 e 25-31 ausentes
-- MED-I	todos os sinais WT presentes	todos os sinais WT ausentes
-- SEA	todos os sinais WT presentes	todos os sinais WT ausentes
-- THAI	todos os sinais WT presentes	todos os sinais WT ausentes
-- FIL	todos os sinais WT presentes	todos os sinais WT ausentes

Tal como acontece com qualquer teste de diagnóstico, os resultados do α-Globin StripAssay® devem ser interpretados no contexto do fenótipo clínico global do paciente e de outras investigações médicas à disposição do médico. A ViennaLab Diagnostics GmbH não é responsável por quaisquer decisões clínicas tomadas.

## VIII. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO

A **exatidão** do α-Globin StripAssay® foi determinada analisando 330 amostras de ADN genómico previamente tipadas. Com exceção de uma amostra, os resultados foram concordantes com o método de referência (sequenciação de Sanger, gap-PCR, ARMS-PCR, reverse dot-blot analysis, amostras derivadas de EQA). Uma amostra heterozigótica polyA-2, resultante de uma recombinação rara das extremidades 3' dos genes *alfa-2* e *pseudo-alfa*, foi tipada como falsa negativa (tipo selvagem) pelo StripAssay®. O ensaio detetou corretamente 359 alelos mutantes (= 99,7% de Concordância Percentual Positiva) e 300 alelos de tipo selvagem (= 100% de Concordância Percentual Negativa).

A **precisão** do α-Globin StripAssay® foi avaliada como a variabilidade entre réplicas, operadores, dias, termocicladores e dispositivos de hibridação. Num total de 62 testes realizados ao abrigo dos parâmetros investigados, 61 apresentaram os resultados de genotipagem esperados e uma amostra falhou devido à imprecisão da pipetagem do ADN modelo. Apenas foram visíveis diferenças negligenciáveis na intensidade de coloração das Teststrips, e não foi observada coloração de fundo. O α-Globin StripAssay® foi validado nos sistemas AB GeneAmp® PCR System 2700, MJ Research PTC-200 e Eppendorf Mastercycler X50s, que representam uma taxa de aquecimento e arrefecimento no intervalo de 1,7 a 6,3 °C/seg e 1,4 a 3,7 °C/seg, respetivamente.

A utilização de outros termocicladores deve ser verificada pelo utilizador.

A **Especificidade Analítica** é assegurada, antes de tudo, pela seleção de iniciadores específicos do gene e de sondas de captura específicas do alelo, bem como pela seleção de condições de reação estridentes. Os iniciadores e as sondas foram verificados quanto a possíveis homologias com todas as sequências publicadas em bases de dados de genes por análise de comparação de sequências. Desta forma, foi assegurada a detetabilidade de todos os génotipos relevantes. A possível reatividade cruzada entre sondas de captura foi verificada por ADN sintético que contém o fragmento de gene respetivo. Não foi observada reatividade cruzada.

**Desempenho clínico:** Num estudo comparativo multicêntrico (Puehringer et al. 2007), um total de 272 amostras de doentes provenientes da área de influência de oito centros de talassemia diferentes em todo o mundo foi testado com o α-Globin StripAssay® e os métodos de referência utilizados regularmente nestes laboratórios. Dos 544 alelos de α-globina de tipo selvagem ou mutante na coorte de doentes, os resultados de 523 (96,14%) foram completamente concordantes entre o StripAssay® e os métodos internos.

## IX. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Foram testadas cinco substâncias interferentes (hemoglobina, imunoglobina G, vestígios de sangue, etanol e EDTA) potencialmente presentes em preparações de ADN derivadas de sangue com EDTA. Os seus efeitos na PCR foram avaliados em três amostras de ADN purificado, às quais foram adicionadas várias concentrações das substâncias, e comparados com os respetivos controlos sem adição de quaisquer substâncias interferentes. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

Uma concentração final de <10 µM de hemoglobina, 0,1 µM de imunoglobulina G, <1% de sangue periférico, 1,25% de etanol ou 0,1 mM de EDTA na reação não interferiram no desempenho do StripAssay®.

## **X. LIMITAÇÕES DO ENSAIO**

O  $\alpha$ -Globin StripAssay® foi exclusivamente concebido para o diagnóstico de 21 mutações conhecidas, conforme listado na secção III, que são representadas por sondas de captura específicas do alelo nas Teststrips. Outras deleções de alfa-globina, mutações pontuais ou recombinações que possam estar presentes numa amostra do doente não podem ser detetadas. Na melhor das hipóteses, uma mutação pontual ignorada localizada dentro da sequência abrangida por uma sonda de captura, pode ser indicada pela perda de sinal de tipo selvagem na Teststrip quando está presente concomitantemente com uma deleção de um gene único ou duplo, ou no estado homozigótico.

Variantes raras ou privadas dentro de locais de ligação de iniciadores e sondas, bem como conversões de genes, podem levar à falha na amplificação e à ausência de sinais nas Teststrips.

O  $\alpha$ -Globin StripAssay® não permite distinguir entre o estado heterozigótico e o estado mutante homozigótico da triplicação do gene anti-3,7 (anti-3,7/ $\alpha\alpha$  e anti-3,7/anti-3,7).

Na presença de grandes deleções de genes não detetáveis pelo ensaio, as deleções de um único gene (-3,7 ou -4,2) e as mutações pontuais aparecem como homozigóticas.

O  $\alpha$ -Globin StripAssay® não deve ser utilizado para fins de diagnóstico pré-natal ou diagnóstico genético pré-implantação. O ensaio não foi validado em amostras derivadas da biópsia das vilosidades coriônicas, líquido amniótico ou sangue do cordão umbilical.

O  $\alpha$ -Globin StripAssay® destina-se apenas a uma utilização profissional em laboratório.

## **XI. CONSIDERAÇÕES DE QUALIDADE**

- É necessária uma compreensão profunda do procedimento aqui descrito, bem como das técnicas de laboratório padrão e do equipamento adequado para obter resultados fiáveis.
- Não utilize os kits StripAssay® para além da respetiva data de validade.
- Após a primeira abertura do recipiente primário, os reagentes StripAssay® são estáveis até à data de validade impressa no rótulo exterior do kit quando armazenados corretamente a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C.
- Utilize pontas de pipeta descartáveis estéreis com filtros para evitar a contaminação microbiana e a contaminação cruzada de reagentes ou amostras. Não troque as tampas dos frascos.
- Apenas para utilização única.

## **XII. SEGURANÇA**

- Não beba, coma, fume ou aplique cosméticos nas áreas de trabalho designadas. Use batas de laboratório e luvas descartáveis ao manusear amostras e reagentes do kit. Lave bem as mãos após a utilização.
- Manuseie as amostras como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Limpe e desinfete cuidadosamente todos os materiais e superfícies que tenham estado em contacto com as amostras. Elimine todos os resíduos associados a amostras clínicas num recipiente para resíduos biológicos.
- Evite o contacto de DNAT e Color Developer com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente com água em abundância. Em caso de derramamento, dilua com água antes de limpar e secar.
- Cumpra todos os regulamentos de segurança e ambientais locais e federais que possam ser aplicáveis.



### **XIII. APOIO TÉCNICO**

O apoio técnico pode ser obtido através de:

- o distribuidor local da ViennaLab Diagnostics ([www.viennalab.com/distribution](http://www.viennalab.com/distribution))
- Vídeos Tutoriais ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- o Manual do StripAssay® ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- o Guia de Resolução de Problemas do StripAssay® ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- contactando [techhelp@viennalab.com](mailto:techhelp@viennalab.com)












### **XIV. REFERÊNCIAS**

- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man ([www.omim.org](http://www.omim.org))
- Base de dados HbVar (<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. COMENTÁRIOS AO FABRICANTE**

Qualquer incidente grave ocorrido relacionado com o StripAssay® deve ser comunicado à autoridade competente do país e ao fabricante.

## XVI. SÍMBOLOS

	Número de catálogo
	Código do lote
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Em conformidade com o Regulamento europeu relativo ao DIV 2017/746
0123	Número de identificação do organismo notificado
	Suficiente para <n> testes
	Limites de temperatura de conservação
	Data de validade
	Cuidado
	Fabricante
	Data de fabrico
	Consultar as Instruções de utilização

XVII. EXEMPLOS DE RESULTADOS DO TESTE

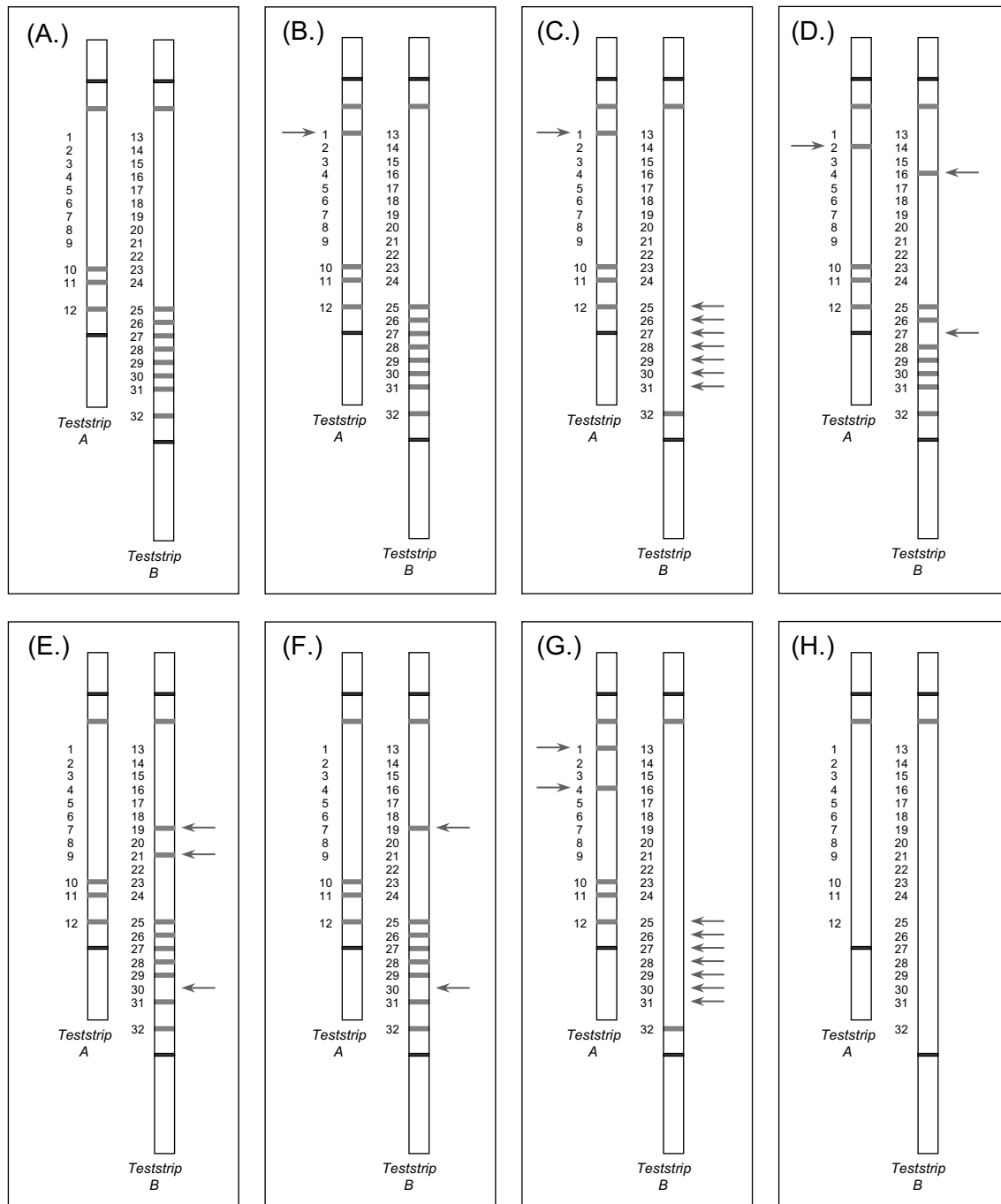



Fig. 3: Exemplos de resultados obtidos com o  $\alpha$ -Globin StripAssay<sup>®</sup>

- (A.) normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ )
- (B.) -3,7 heterozigótico (-3,7/ $\alpha\alpha$ )
- (C.) -3,7 homozigótico (-3,7/-3,7)
- (D.) -4,2 + IVS1-5nt heterozigótico (-4,2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse heterozygous (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring homozigous (HbCS/HbCS)
- (G.) -3,7 + --MED-I heterozigótico (-3,7/--MED-I)
- (H.) controlo negativo ou falha na PCR

**NOTAS**

## XVIII. PRODUTOS RELACIONADOS

<b>REF</b>		
4-125	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> AZE1	20 testes
4-126	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> AZE2	20 testes
4-130	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> MED	20 testes
4-140	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> IME	20 testes
4-150	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> SEA	20 testes
4-160	$\alpha$ -Globin StripAssay <sup>®</sup>	10 testes
4-170	$\beta$ -Thal Modifier StripAssay <sup>®</sup>	20 testes
CS-012	StripAssay <sup>®</sup> Detection Reagents	20 testes
CS-017	StripAssay <sup>®</sup> Detection Reagents 48	48 testes
2-014	GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System	100 extrações
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 extrações
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](mailto:info@viennalab.com)

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