

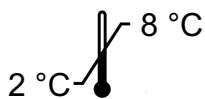
α -Globin StripAssay[®]

Instrucțiuni de utilizare

REF



4-160	10 teste
4-160-A	24 de teste
4-160-TRIAL	5 teste



IVD



Versiune: revizuirea 1.3/română
Documentele eIFU și alte limbi sunt disponibile pe
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

CONȚINUT

I.	SCOPUL UTILIZĂRII.....	4
II.	BACKGROUND.....	4
III.	METODOLOGIE.....	4
IV.	COMPONENTELE KITULUI	6
V.	MATERIALE NECESARE CARE NU SUNT FURNIZATE	7
VI.	PROCEDURA ASSAY	8
VII.	INTERPRETAREA REZULTATELOR.....	12
VIII.	EVALUAREA PERFORMANȚELOR.....	14
IX.	SUBSTANȚE PERTURBATOARE	14
X.	LIMITĂRILE TESTULUI	15
XI.	CONSIDERAȚII PRIVIND CALITATEA.....	15
XII.	SIGURANȚĂ	15
XIII.	ASISTENȚĂ TEHNICĂ.....	16
XIV.	REFERINȚE	16
XV.	FEEDBACK PENTRU PRODUCĂTOR.....	16
XVI.	SIMBOLURI.....	17
XVII.	EXEMPLE DE REZULTATE ALE TESTULUI	18
XVIII.	PRODUSE SIMILARE.....	20

ISTORICUL REVIZUIRILOR:

versiune	dată	descriere
revizuirea 1.1	2022-02	Marcajul CE cu numărul de identificare al organismului notificat; legătura cu SSP; declarație privind sursa eșantionului și utilizarea manuală/semiautomată (I); specificația componentelor kitului (IV); date privind performanța clinică (VIII)
revizuirea 1.2	2022-05	Data emiterii, trimitere la IFU electronic (eIFU), Iran (II) inclus
revizuirea 1.3	2022-11	Îmbunătățirea aspectului și a rezoluției Figurilor

Rezumatul siguranței și performanței (SSP, Summary of Safety and Performance) pentru StripAssay® poate fi obținut din Baza de date europeană privind dispozitivele medicale (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> sau de la producător.

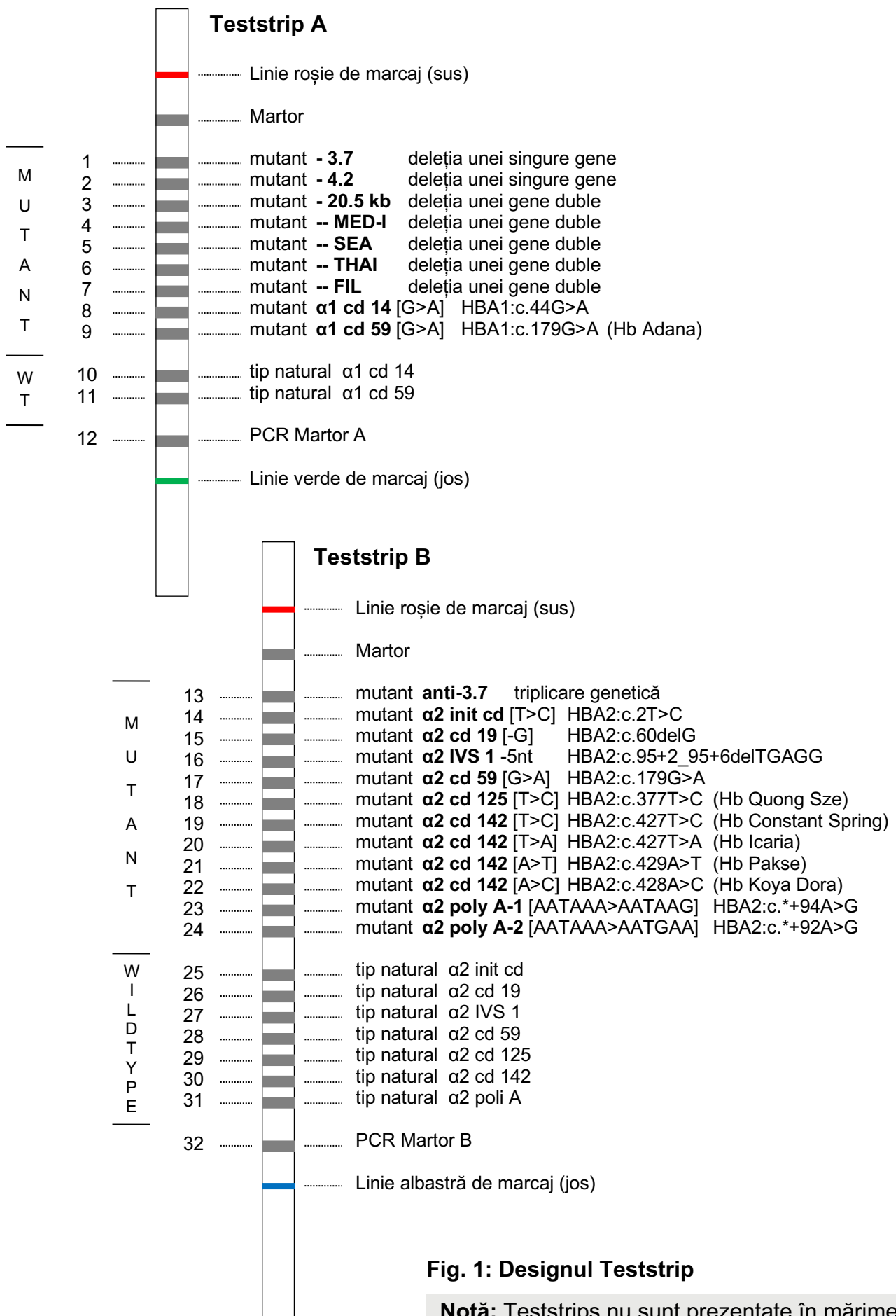


Fig. 1: Designul Teststrip

Notă: Teststrips nu sunt prezentate în mărime reală și nu trebuie să fie folosite pentru interpretarea rezultatelor!

I. SCOPUL UTILIZĂRII

α-Globin StripAssay® este un test genetic calitativ pentru analiza țintită a 21 de deleții mari și mutații punctiforme comune ale genelor *subunității alfa 1 a hemoglobinei (HBA1, hemoglobin subunit alpha 1)* și *alfa 2 (HBA2, hemoglobin subunit alpha 2)* în ADN izolat din sângele periferic uman. Testul este utilizat ca auxiliar pentru a confirma genetic un diagnostic suspectat de alfa-talasemie (alfa-tal). În plus, testul poate fi utilizat pentru depistarea statutului de purtător de talasemie la rudele pacientului și la populația generală. StripAssay® poate fi efectuat manual sau semi-automat.

Pentru diagnosticarea *in vitro* la oameni.

II. BACKGROUND

Mutațiile în genele *alpha-globin* reprezintă cauza genetică a alfa-talasemiei, o afecțiune ereditară autozomal recesivă, care se caracterizează prin producerea insuficientă sau absența lanțului alfa-globinei, ceea ce determină un tablou clinic variabil în funcție de numărul de alele afectate.

Pacienții cu valori hematologice caracteristice anemiei microcitare și cu modele de hemoglobină corespunzătoare, membrii familiei unui pacient afectat, viitorii părinți, precum și persoanele din populațiile cu risc ridicat (de exemplu, regiunea mediteraneană, Africa, Peninsula Arabică, Iran, India și Asia de Sud-Est), care prezintă riscul de a fi purtători de alfa-talasemie ar trebui să fie testați.

III. METODOLOGIE

α-Globin StripAssay® se bazează pe reacția în lanț a polimerazei (PCR, polymerase chain reaction) și pe hibridizarea inversă. Procedura include trei pași: (1) Izolarea ADN-ului, (2) amplificarea PCR folosind primeri biotinilați, (3) hibridizarea produselor de amplificare pe un Teststrip care conține mostre oligonucleotidice alele specifice, imobilizate ca o matrice de linii paralele (Fig. 1). Secvențele biotinite legate sunt detectate folosind streptavidină-fosfatază alcalină și substraturi colorate.

Testul α-Globin StripAssay® detectează următoarele mutații în locusul genei *alpha-globin*:

nume moștenire	Nomenclator 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 triplicare genetică	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 inițiere 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

Secvență de referință (RefSeq, Reference Sequence):

NG_000006.1



NM_000558.3 (HBA1)

NM_000517.4 (HBA2)

Testul poate fi efectuat manual sau semi-automat cu ajutorul unor instrumente concepute pentru automatizarea procesării Teststrips (consultați secțiunea VI. 3.4).

IV. COMPONENTELE KITULUI

REF

	4-160	4-160-A	4-160 -TRIAL
1a. Amplification Mix A1 (<i>capac galben</i>)	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
1b. Amplification Mix A2 (<i>capac alb</i>)	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
1c. Amplification Mix B (<i>capac verde</i>)	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
2. Taq Dilution Buffer (<i>capac transparent</i>)	500 µl	500 µl	500 µl
3. HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (<i>capac roșu</i>)	125 U	175 U	125 U
4. DNAT (<i>capac albastru</i>)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Atenție: DNAT conține 1,6 % NaOH H315: Provoacă iritarea pielii H319: Provoacă iritarea gravă a ochilor P280: Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/protecție pentru ochi/protecție pentru față P337 + P313: Dacă iritația ochilor persistă: Solicitați asistență medicală</p>			
5. Typing Trays	3	---	2
6a. Teststrips A (<i>capac negru</i>)	10	24	5
6b. Teststrips B (<i>capac alb</i>)	10	24	5
7. Hybridization Buffer (<i>capac alb</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
8. Wash Solution A (<i>capac alb</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
9. Conjugate Solution (<i>capac transparent</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
10. Wash Solution B (<i>capac transparent</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
11. Color Developer (<i>capac maro</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Atenție: Color Developer conține ≤ 0,4% acid maleic H317: Poate provoca o reacție alergică a pielii P280: Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/protecție pentru ochi/protecție pentru față P302 + P352: În caz de contact cu pielea: spălați cu multă apă P333 + P313: Dacă apar iritații sau erupții cutanate: solicitați asistență medicală</p>			
12. Instrucțiuni de utilizare	1	1	1
13. Collector™ Sheet	1	3	1

Notă: Depozitați toți reactivii la o temperatură cuprinsă între 2 °C și 8 °C atunci când nu sunt utilizați!

numele compusului	compoziția
Amplification Mix A1/A2/B	oligonucleotide marcate cu 5'-biotină specifică secvenței, un amestec echimolar de trifosfați deoxi ribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP și dTTP), MgCl ₂ , tampon de sulfat de amoniu, betaină, 0,05% azidă de sodiu
Taq Dilution Buffer	tampon pentru HS-Taq DNA Polymerase, inclusiv KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ și MgCl ₂ , 0,05% azidă de sodiu
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	hot-start-Taq DNA polymerase cu o concentrație de 5U/µl
DNAT	soluție bazică ce conține 1,6 % hidroxid de sodiu și un colorant albastru care indică o modificare a pH-ului
Typing Trays	tavă de plastic cu opt godeuri

numele compusului	compoziția
Teststrips A/B	sonde oligonucleotide specifice alelei și un martor de hibridizare imobilizat sub formă de o serie de linii paralele pe o membrană pe suport de poliester încadrată de o linie roșie în partea superioară și de o linie verde (Teststrip A) sau albastră (Teststrip B) în partea inferioară
Hybridization Buffer	tampon fosfat cu <2% detergent
Wash Solution A	tampon citrat cu <1% detergent
Conjugate Solution	fosfatază alcalină conjugată cu streptavidină diluată într-un tampon pe bază de soluție salină cu 0,05% azidă de sodiu
Wash Solution B	tampon Tris conținând <2% detergent și 0,05% azidă de sodiu
Color Developer	substratul de culoare pentru fosfataza alcalină conține nitrobluetetrazolium (NBT, nitro blue tetrazolium,) și 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfat (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate).
Instrucțiuni de utilizare	hârtie tipărită
Collector™ Sheet	hârtie tipărită

V. MATERIALE NECESARE CARE NU SUNT FURNIZATE

Pe lângă echipamentul standard al unui laborator de biologie moleculară, sunt necesare următoarele:

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- Termociclor cu capac încălzit (pentru specificațiile privind ratele de rampă, consultați secțiunea VIII)
- Baie de apă cu platformă de agitare, capac și temperatură reglabilă (45 °C ± 1 °C)
- Agitator (balansoar sau agitator orbital)

Opțional:

- Aparat de aspirație prin vacuum
- Agitator termic pentru plăci de microtitrare cu capac și temperatură reglabilă (45 °C ± 1 °C), de exemplu PST-60 HL (Biosan) sau un dispozitiv echivalent
- Instrument pentru hibridizare automată, reglabil în funcție de profilul timp-temperatură, după cum este descris în secțiunea VI. 3.4, DYNABLOT Heat (Dynex) sau un dispozitiv echivalent
- Echipament de electroforeză pe gel de agaroză (pentru controlul produselor de amplificare)

VI. PROCEDURA ASSAY

1. Pregătirea mostrelor

Specimen: Utilizați sânge proaspăt sau congelat cu anticoagulant EDTA. Sângele care conține heparină sau citrat nu a fost testat. Nu depozitați sângele mai mult de 3 zile la temperatura ambiantă sau mai mult de 1 săptămână la o temperatură cuprinsă între 2 °C și 8 °C înainte de utilizare. Sângele care a fost păstrat congelat mai mult de un an sau care a trecut prin mai mult de trei cicluri de congelare-dezghețare nu se utilizează. Pentru recoltarea și transportul specimenului, urmați instrucțiunile de utilizare a tubului de recoltare a sângelui EDTA și recomandările generale pentru prelevarea sângelui.

Extragerea ADN-ului: Aduceți probele de sânge la temperatura camerei. Amestecați bine răsturnând cu atenție de mai multe ori tuburile de recoltare a sângelui. Se repetă operația de amestecare de fiecare dată înainte de a se extrage o parte alicotă de sânge. Se recomandă să se utilizeze **Spin Micro DNA Extraction Kit** (REF 2-020, ViennaLab) pentru izolarea ADN-ului din sângele integral. Utilizarea altor metode de izolare a ADN-ului cu α-Globin StripAssay® nu a fost validată. În cazul în care se utilizează alte sisteme de extracție a ADN-ului, concentrația și puritatea ADN-ului trebuie să fie cuprinse între 2 și 10 ng/μl și un raport OD_{A260/280} de 1,7 la 2,0. Concentrațiile mai mari de ADN trebuie să fie diluate până la intervalul recomandat, înainte de introducerea PCR.

Notă: ADN-ul care conține inhibitori PCR și/sau particule magnetice provenite din sistemul de extracție pe bază de microsferă poate fi refractar la amplificare și trebuie diluat la 2 ng/μl folosind apă de calitate PCR.

ADN-ul extras se depozitează la o temperatură cuprinsă între 2 °C și 8 °C (maximum o săptămână) sau la o temperatură cuprinsă între -30 °C și -15 °C (pe termen lung), până la efectuarea analizei.

2. Amplificarea in vitro (PCR) – 3 reacții separate per probă

Important: Păstrați toți reactivii PCR și toate șabloanele de ADN refrigerate pe tot parcursul procesului.

- Preparați proaspăt de fiecare dată o cantitate adecvată de soluție de lucru (1:15, concentrație finală, 0,33 U/μl) de **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, capac roșu) în **Taq Dilution Buffer** (capac transparent) pentru numărul de probe care vor fi analizate, plus o **probă fără șablon** (NTC, no-template control).

compus	pe reacție	de ex., 10 reacții
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,33 μl	3,3 μl
Taq Dilution Buffer	4,67 μl	46,7 μl
soluție de lucru	5 μl	50 μl

- Pregătiți trei tuburi de reacție pentru fiecare probă care va fi amplificată. Plasați tuburile pe gheață.
- Pentru fiecare probă pregătiți 3 amestecuri finale de reacție PCR (A1, A2, B) pe gheață:
 - A1: **15 μl Amplification Mix A1** (capac galben)
5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluție (1,66 U)
5 μl șablon ADN
 - A2: **15 μl Amplification Mix A2** (capac alb)
5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluție (1,66 U)
5 μl șablon ADN
 - B: **15 μl Amplification Mix B** (capac verde)
5 μl HS-Taq DNA Polymerase diluție (1,66 U)
5 μl șablon ADN

Notă: Este recomandat să pregătiți un amestec principal pentru toate probele, care să conțină un Amplification Mix și HS-Taq DNA Polymerase diluată. Pipetați mai întâi 20 μl de amestec principal în fiecare tub PCR, apoi adăugați șablonul ADN. Includeți un NTC în fiecare serie, utilizând apă de calitate PCR în loc de ADN (sau, de preferință, martorul negativ al extracției de ADN).

În general, pregătiți soluțiile de lucru/amestecul principal cu un exces de volum de 10 % pentru a compensa inexactitățile de pipetare.

- Închideți bine tuburile. Preîncălziți termociclorul la 95 °C.
- Introduceți tuburile de reacție executați următorul program de termociclare:
 - pre-PCR: 95 °C/5 min.**
 - termociclare: 97°C/40 sec. – 64°C/40 sec. – 72 °C/1:30 min. (3 cicluri)**
97°C/40 sec. – 58°C/40 sec. – 72 °C/1:30 min. (37 de cicluri)
 - extinderea finală: 72 °C/5 min.**
- Depozitați produsele de amplificare la gheață sau la o temperatură cuprinsă între 2 °C și 8 °C pentru utilizare ulterioară.

Opțional: Analizați produsele de amplificare prin electroforeză pe gel (de exemplu, gel de agaroză 3%).

Lungimile fragmentelor: 881 bp; deleții: 1783 bp (A1)
 296 bp; deleții: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 bp (A2)
 302, 864 bp; deleții: 1.772 bp (B)

3. Procesarea Teststrips

3.1. Hibridizare (manuală) – 2 Teststrips pentru fiecare probă (45 °C, baie de apă cu agitare)

Important: Reglați nivelul apei din baia de apă la aproximativ ½ din înălțimea Typing Tray. Încălziți baia de apă la exact 45 °C. Verificați temperatura apei cu un termometru calibrat. Preîncălziți Hybridization Buffer și Wash Solution A la 45 °C. Aveți grijă ca toate precipitatele formate la 2 °C – 8 °C să se dizolve complet. Lăsați Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B și Color Developer să ajungă la temperatura camerei. Preparați Typing Trays.

Îndepărtați câte un Teststrip A și un Teststrip B pentru fiecare probă, folosind o pensetă curată. Atingeți Teststrips doar cu mânuși fără pudră! Etichetați Teststrips în afara liniilor de marcaj cu un creion (fără pixuri, markere etc.).

Pentru toate **Teststrips A** (un culoar pentru fiecare probă):

- Pipetați **20 µl DNAT** (capac albastru) în colțul inferior al fiecărui culoar care urmează să fie utilizat în Typing Trays.
- Adăugați **10 µl de produs de amplificare A1** în picătura corespunzătoare de DNAT.
- Adăugați **10 µl de produs de amplificare A2** în aceeași picătură.
- Amestecați bine cu o pipetă. (Soluția va rămâne albastră.)

- Lăsați soluția să stea **5 min.** la temperatura camerei.
- Adăugați **1 ml Hybridization Buffer** (preîncălzit la 45 °C) în fiecare culoar. Agitați ușor tava. (Culoarea albastră va dispărea.)
- Introduceți **Teststrip A** sau **Teststrip B** cu partea marcată în sus (liniile vizibile!) în culoarele respective. Scufundați complet.
- Incubați timp de **30 min.** la **45 °C** pe platforma de agitare a băii de apă.

Setați o frecvență de agitare moderată (aprox. 50 rpm) pentru a evita vărsarea. Lăsați capacul băii de apă închis pentru a evita variațiile de temperatură.

- La sfârșitul incubării, eliminați soluțiile de hibridizare prin aspirare cu vacuum sau prin pipetare.

Procedați imediat. Nu lăsați Teststrips să se usuce în timpul întregii proceduri.

3.2. Spălare riguroasă (45 °C, baie de apă cu agitare)

- Adăugați **1 ml de Wash Solution A** (preîncălzită la 45 °C). Clătiți puțin (10 sec.). Îndepărtați lichidele prin aspirare sau pipetare.
- Adăugați **1 ml de Wash Solution A** (45 °C).
- Incubați timp de **15 min.** la **45 °C** în baia de apă cu agitare. Îndepărtați lichidele prin aspirare sau pipetare.
- Adăugați **1 ml de Wash Solution A** (45 °C).
- Incubați timp de **15 min.** la **45 °C** în baia de apă cu agitare. Îndepărtați lichidele prin aspirare sau pipetare.

3.3. Detecția colorimetrică (la temperatura camerei, 22 °C ± 3 °C)

- Adăugați **1 ml de Conjugate Solution**.
- Incubați timp de **15 min.** la **temperatura camerei** pe un balansoar sau un agitator orbital. Îndepărtați lichidele prin aspirare sau pipetare.
- Adăugați **1 ml de Wash Solution B**. Clătiți puțin (10 sec.). Îndepărtați lichidele prin aspirare sau pipetare.
- Adăugați **1 ml de Wash Solution B**.
- Incubați timp de **5 min.** la **temperatura camerei** pe un balansoar sau un agitator orbital. Îndepărtați lichidele prin aspirare sau pipetare.
- Adăugați **1 ml de Wash Solution B**.
- Incubați timp de **5 min.** la **temperatura camerei** pe un balansoar sau un agitator orbital. Îndepărtați lichidele prin aspirare sau pipetare.
- Adăugați **1 ml de Color Developer**.
- Incubați timp de **15 min.** la **temperatura camerei** în întuneric pe un balansoar sau un agitator orbital. În cazul unei reacții pozitive va apărea o colorație purpurie.
- Spălați Teststrips de mai multe ori cu apă distilată. Lăsați benzile să se usuce la întuneric pe o hârtie absorbantă.

Nu expuneți Teststrips la lumină puternică după dezvoltarea culorilor.

3.4. Hibridizarea (automată) – opțională în loc de utilizarea băii de apă și agitatorului.

Un instrument pentru prelucrarea automată a Teststrips trebuie să îndeplinească următoarele cerințe:

- Profilul programabil de timp și temperatură trebuie să corespundă cu secțiunea 3.1 din 3.3 procedura StripAssay®.
- Stație integrată de preîncălzire pentru Hybridization Buffer și Wash Solution A.
- Controlul temperaturii tăvilor în timpul etapelor de hibridizare și spălare riguroasă la 45 °C ± 1 °C.
- Sistem activ de răcire a tăvii pentru a asigura o scădere rapidă a temperaturii în etapele de detecție colorimetrică la temperatura camerei.
- Posibilitate de agitare a tăvii.
- Capac încălzit al tăvii pentru a se evita evaporarea reactivilor în timpul incubării.
- Distribuirea unor volume definite de reactivi.
- Aspirarea reactivilor.
- În funcție de instrumentul utilizat și de numărul de probe procesate într-o singură serie, pot fi necesari reactivi suplimentari. Sunt disponibili reactivi de detecție StripAssay® Detection Reagents suplimentari pentru 20 de teste (REF CS-012) și 48 de teste (REF CS-017).

VII. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Genotipul unei probe se determină de pe Teststrip A și B cu ajutorul Collector™ Sheet anexate. Puneți ambele Teststrip prelucrate în câmpurile desemnate, aliniați-le la desenul schematic folosind linia de marcare roșie (sus) și linia de marcare albastră (jos) și fixați-le cu bandă adezivă.

O reacție pozitivă a liniei de control din partea superioară indică funcționarea corectă a Conjugate Solution și a Color Developer. Această linie trebuie să se coloreze întotdeauna pozitiv.

O reacție pozitivă a liniilor PCR Martor A și PCR Martor B indică prezența produselor de amplificare corecte. Aceste linii trebuie să se coloreze întotdeauna pozitiv, cu excepția matorului fără șablon, care conține apă în locul șablonului de ADN (a se vedea exemplul H, pag. 18).

Absența matorilor PCR pe Teststrips ar putea indica o hibridizare falsă a produselor de amplificare Mix A1/A2 pe Teststrip B și a produselor de amplificare Mix B pe Teststrip A. Repetați testarea.

Pentru fiecare poziție polimorfă, trebuie să se obțină unul dintre următoarele modele de colorare (Fig. 2):

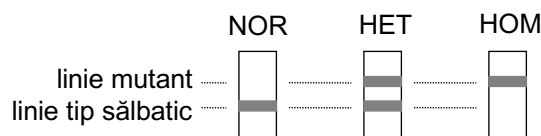


Fig. 2: Genotipuri – modele de colorare pe Teststrips

	linie tip sălbatic	linie mutant	genotip
NOR	pozitiv	negativ	normal
HET	pozitiv	pozitiv	heterozigot
HOM	negativ	pozitiv	mutant homozigot

Notă: Intensitatea de colorare a liniilor pozitive poate varia. Acest lucru nu are nicio importanță pentru rezultat.

Vedeți exemplele de rezultate pentru StripAssay®, la pagina 18 (Fig. 3).

Unele dintre mutațiile punctuale acoperite de α-Globin StripAssay® sunt localizate în câteva dintre nucleotidele de pe gena *α-globin*. Pe Teststrips, acestea sunt reprezentate de o sondă comună de tip natural, astfel încât cele 21 de mutații sunt acoperite doar de 9 sonde de tip natural:

linie	probă tip natural	mutație
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 poli A	α2 poli A-1, α2 poli A-2

Probele care sunt heterozigote compuse pentru două dintre aceste mutații (de exemplu, Hb Constant Spring + Hb Pakse) vor fi lipsite de semnalul comun de tip natural (a se vedea exemplul E, pagina 18).

Probele care sunt heterozigote compuse pentru una dintre mutațiile α1/α2 și o deleție genetică simplă sau dublă vor fi, în cele mai multe cazuri, lipsite de semnalul de tip natural respectiv (a se vedea exemplul D, pag. 18).

În cazul delețiilor genetice simple și duble, mai multe sonde de tip natural fac distincția între starea heterozigotă și cea homozigotă a mutantului (a se vedea exemplele B și C, pag. 18):

deleție	heterozigot	mutant homozigot
- 3,7	toate semnalele WT prezente	Semnale WT 25-31 absente
- 4,2	toate semnalele WT prezente	Semnale WT 25-31 absente
- 20,5 kb	toate semnalele WT prezente	Semnale WT 10 și 25-31 absente
-- MED-I	toate semnalele WT prezente	toate semnalele WT sunt absente
-- SEA	toate semnalele WT prezente	toate semnalele WT sunt absente
-- THAI	toate semnalele WT prezente	toate semnalele WT sunt absente
-- FIL	toate semnalele WT prezente	toate semnalele WT sunt absente

Ca în cazul oricărui test de diagnosticare, rezultatele α-Globin StripAssay® trebuie interpretate în contextul fenotipului clinic general al pacientului și al altor investigații medicale de care dispune medicul. ViennaLab Diagnostics GmbH nu este responsabilă pentru nicio decizie clinică care este luată.

VIII. EVALUAREA PERFORMANTELOR

Acuratețea α-Globin StripAssay® a fost determinată prin analizarea a 330 de probe pretipate de ADN genomic. Cu excepția unei singure probe, rezultatele au fost în concordanță cu metoda de referință (secvențiere Sanger, gap-PCR, ARMS-PCR, analiză dot-blot inversă, probe derivate EQA). O mostră heterozigotă poliA-2, rezultată dintr-o recombinare rară a capetelor 3' ale genelor *alfa-2* și *pseudo-alfa*, a fost tipizată fals negativ (tip natural) prin testul StripAssay®. Testul a detectat corect 359 de alele mutante (= 99,7 % acord procentual pozitiv) și 300 de alele de tip natural (= 100 % acord procentual negativ).

Precizia α-Globin StripAssay® a fost evaluată ca variabilitate între replici, operatori, zile, termocicloare și dispozitive de hibridizare. Într-un de 62 de teste efectuate în conformitate cu parametrii investigați, 61 au indicat rezultatele de genotipare așteptate, iar un eșantion a eșuat din cauza inexactității pipetării ADN-ului șablon. Au fost vizibile doar diferențe neglijabile în ceea ce privește intensitatea de colorare a Teststrips și nu s-a observat nicio colorare de fond. α-Globin StripAssay® a fost validat pe AB GeneAmp® PCR System 2700, MJ Research PTC-200 și Eppendorf Mastercycler X50s, care reprezintă o rată de încălzire și răcire în intervalul 1,7 - 6,3 °C/sec și, respectiv, 1,4 - 3,7 °C/sec.

Utilizarea altor termocicloare trebuie verificată de către utilizator.

Specificitatea analitică este asigurată în primul rând prin selectarea primerilor specifici pentru fiecare genă și a sondelor de captură specifice pentru fiecare alelă, precum și prin selectarea unor condiții de reacție riguroase. Primerii și sondele au fost verificate pentru posibile omologii cu toate secvențele publicate în bazele de date genetice prin analiza de comparare a secvențelor. Astfel, a fost asigurată detectabilitatea tuturor genotipurilor relevante. Potențiala reactivitate încrucișată între sondele de captare a fost verificată cu ajutorul ADN-ului sintetic care conține fragmentul genetic respectiv. Nu s-a observat nicio reactivitate încrucișată.

Performanțele clinice: Într-un studiu comparativ multicentric (Puehringer et al. 2007), un total de 272 de eșantioane de pacienți din zona de acoperire a opt centre de talasemie din întreaga lume a fost testat cu α-Globin StripAssay® și cu metodele de referință utilizate în mod obișnuit în aceste laboratoare. Dintre cele 544 de alele de α-globină de tip sălbatic sau mutant din lotul de pacienți, rezultatele pentru 523 (96,14%) au fost în concordanță deplină între StripAssay® și metodele interne.

IX. SUBSTANȚE PERTURBATOARE

Au fost testate cinci substanțe perturbatoare (hemoglobină, imunoglobulină G, urme de sânge, etanol și EDTA) care ar putea fi prezente în preparatele de ADN derivate din sânge cu EDTA. Efectele acestora asupra PCR au fost evaluate în trei probe de ADN purificat îmbogățite cu diferite concentrații de substanțe și comparate cu martorii acestora fără adaos de substanțe perturbatoare. Toate probele au fost analizate în trei exemplare.

La o concentrație finală de <10 μM de hemoglobină, 0,1 μM de imunoglobulină G, <1% sânge periferic, 1,25% etanol sau 0,1 mM EDTA în reacție nu au influențat performanțele StripAssay®.

X. LIMITĂRILE TESTULUI

α-Globin StripAssay® este conceput exclusiv pentru diagnosticarea a 21 mutații cunoscute, așa cum este prezentat în secțiunea III, care sunt reprezentate de sonde de captare specifice alele de pe Teststrips. Nu pot fi detectate alte deleții alpha-globină, mutații punctiforme sau recombinări care pot fi prezente în proba unui pacient. În cel mai bun caz, o mutație punctiformă ignorată, localizată în secvența acoperită de o sondă de captare, poate fi indicată prin pierderea semnalului de tip natural pe Teststrip atunci când este prezentă concomitent cu o deleție de genă unică sau dublă în stare homozigotă.

Variantele rare sau excepțiile privind locațiile de joncțiune a primerilor și a sondelor, precum și conversiile genetice pot duce la eșecuri ale amplificării și la lipsa semnalelor pe Teststrips.

Testul α-Globin StripAssay® nu permite să se facă distincția între starea mutantă heterozigotă și homozigotă a triplicării genei anti-3.7 (anti-3,7/αα și anti-3,7/anti-3,7).

În prezența unor deleții genetice mari care nu pot fi detectate prin acest test, delețiile unei singure gene (-3,7 sau -4,2) și mutațiile punctiforme apar ca homozigote.

α-Globin StripAssay® nu trebuie să fie utilizat în scopul diagnosticării prenatale sau al diagnosticării genetice preimplantaționale. Testul nu a fost validat pe eșantioane derivate din prelevarea de probe din vilozități coriale, lichid amniotic sau sânge din cordonul ombilical.

α-Globin StripAssay® este destinat exclusiv utilizării în laborator de către profesioniști.

XI. CONSIDERAȚII PRIVIND CALITATEA

- Pentru a obține rezultate relevante, este necesară o înțelegere aprofundată a procedurii descrise aici, tehnici standard de laborator și echipamente adecvate.
- Nu utilizați kiturile StripAssay® după data de expirare.
- După prima deschidere a recipientului primar, reactivii StripAssay® sunt stabili până la data de expirare imprimată pe eticheta exterioară a kitului, dacă sunt depozitați corespunzător la o temperatură cuprinsă între 2 °C și 8 °C.
- Utilizați vârfuri de pipetă sterile și de unică folosință cu filtre pentru a evita contaminarea microbiană și contaminarea încrucișată a reactivilor sau a probelor. Nu schimbați între ele capacele flacoanelor.
- Doar pentru o singură utilizare.

XII. SIGURANȚĂ

- Nu beți, nu mâncați, nu fumați și nu utilizați produse cosmetice în zonele de lucru desemnate. Purtați halate de laborator și mănuși de unică folosință atunci când manipulați probele și reactivii din kit. Spălați-vă bine pe mâini după aceea.
- Manipulați probele ca și cum ar putea transmite agenți infecțioși. Curățați și dezinfectați corespunzător toate materialele și suprafețele care au fost în contact cu probele. Aruncați toate deșeurile asociate cu probele clinice într-un container pentru deșeuri cu risc biologic.
- Evitați contactul DNAT și Color Developer cu pielea, ochii sau membranele mucoase. În caz de contact, spălați imediat cu cantități mari de apă. Dacă se varsă, diluați cu apă înainte de a șterge.
- Respectați toate reglementările locale și federale privind siguranța și mediul care se pot aplica.

XIII. ASISTENȚĂ TEHNICĂ

Puteți obține asistență tehnică:

- de la distribuitorul local ViennaLab Diagnostics (www.viennalab.com/distribution)
- din tutorialele video (www.viennalab.com/support)
- din manualul StripAssay® (www.viennalab.com/support)
- din Manualul de depanare (Troubleshooting Guide) StripAssay® (www.viennalab.com/support)
- contactând techhelp@viennalab.com












XIV. REFERINȚE

- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man (www.omim.org)
- Baza de date 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. FEEDBACK PENTRU PRODUCĂTOR

Orice incident grav care a avut loc în legătură cu StripAssay® trebuie raportat autorității competente din țara respectivă și producătorului.

XVI. SIMBOLURI

	Număr catalog
	Cod lot
	Dispozitiv medical de diagnosticare <i>in vitro</i>
	Respectă Regulamentul Parlamentului European 2017/746 privind IVD
0123	Numărul de identificare al organismului notificat
	Suficient pentru <n> teste
	Limite temperatură de depozitare
	Utilizat de
	Atenție
	Producător
	Data fabricației
	Consultați instrucțiunile de utilizare

XVII. EXEMPLE DE REZULTATE ALE TESTULUI

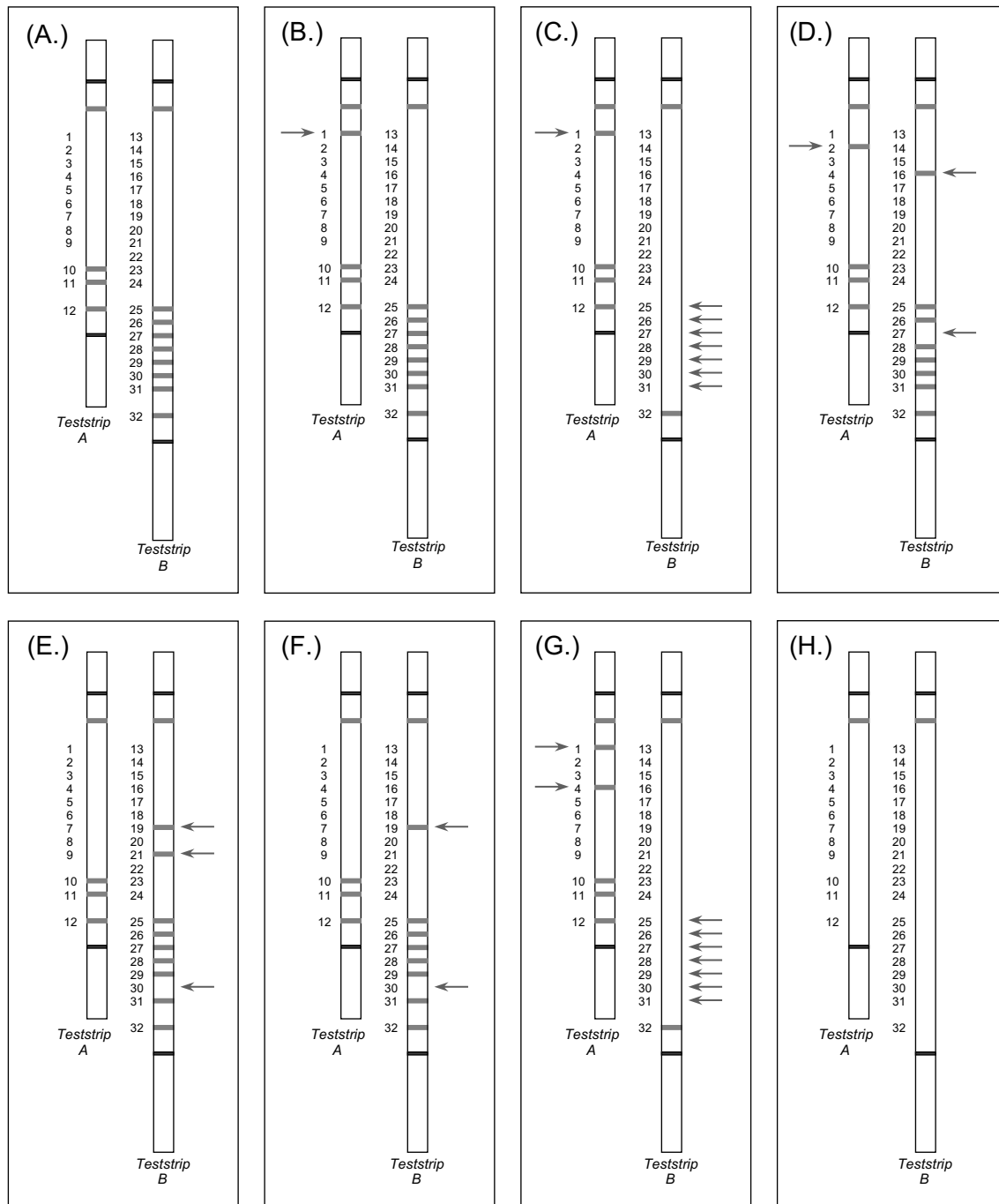



Fig. 3: Exemple de rezultate obținute cu α-Globin StripAssay®

- (A.) normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
- (B.) -3,7 heterozigot (-3,7/ $\alpha\alpha$)
- (C.) -3,7 homozigot (-3,7/-3,7)
- (D.) -4,2 + IVS1-5nt heterozigot (-4,2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse heterozigot (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring homozigot (HbCS/HbCS)
- (G.) -3,7 + --MED-I heterozigot (-3,7/--MED-I)
- (H.) martor negativ sau eșec PCR

NOTE

XVIII. PRODUSE SIMILARE

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

Distribuitor:

 **Producător:**

 **ViennaLab[®]**

ViennaLab Diagnostics GmbH

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

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com