

Istruzioni d'uso

ver. 5 - 15/04/2022

Biologia Molecolare

BETA GLOBINA TEST

REF

AC091

CE



20 TEST

CND

W0106010111

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

SEDE LEGALE: Via Cascina Conighetto - UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALIA

Tel.: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

Organizzazione con Sistema di gestione qualità certificata ISO 9001 e Sistema di gestione qualità settore medicale certificato ISO 13485
(organismo di certificazione IMQ - Certificazione CSQ).

UTILIZZO

Il kit **AC091** fornisce il materiale necessario per l'identificazione di 25 mutazioni del gene beta-globina (**HBB**), coinvolte nelle talassemie di tipo beta, mediante amplificazione delle sequenze bersaglio, ibridazione inversa su striscia e successiva rivelazione colorimetrica.

Il kit è da utilizzare in abbinamento all'enzima di amplificazione con tappo di colore **arancione** ed identificato dal cod. NLM BA092, a cui fa seguito l'indicazione della pezzatura che può variare in funzione delle quantità di enzima fornito (es.: BA092/50, BA092/60, etc).

Il presente dispositivo è stato validato con:

- a) i kit di estrazione manuale su colonnina (cod. NLM AA1001) a partire da sangue intero, cod. NLM AA340 (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) per estrazione di DNA da biopsie di villi coriali e con i più comuni sistemi automatici di estrazione degli acidi nucleici.
- ⇒ b) gli strumenti per PCR PTC 100 (MJ Research); Veriti®, 2720 e GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems); Mastercycler ep gradient S (Eppendorf); T100 (BioRad).
- ⇒ c) strumenti automatici di rivelazione: Tecan ProfiBlot 48 e Dynex Dynablot Heat

INTRODUZIONE

Le talassemie di tipo beta sono un gruppo eterogeneo di emopatie ereditarie recessive, causate da alterazioni del gene beta-globina (HBB) localizzato sul cromosoma 11 che determinano una sintesi ridotta (beta +) o assente (beta 0) delle catene beta del tetramero dell'emoglobina.

La maggior parte delle alterazioni sono singole sostituzioni, delezioni o inserzioni di pochi nucleotidi, più raramente le beta talassemie hanno origine da grosse delezioni geniche.

A livello clinico ed ematologico, le talassemie sono classificate in base alla severità: talassemia minor (portatore di beta talassemia), talassemia intermedia e talassemia major.

Lo stato di portatore di beta talassemia, che risulta da mutazioni in eterozigosi del gene beta-globina, è clinicamente asintomatico ed è definito da caratteristiche ematologiche specifiche. La talassemia major è un'anemia grave, trasfusione-dipendente, mentre la talassemia intermedia comprende un gruppo eterogeneo di manifestazioni cliniche e genotipiche, che spaziano dallo stato asintomatico di portatore allo stato grave trasfusione-dipendente.

L'incidenza annuale di individui sintomatici è stimata 1 su 100000 nel mondo e 1 su 10000 nell'Unione Europea, con tasso di mutazioni di HBB particolarmente elevato nelle popolazioni dell'area mediterranea.

BIBLIOGRAFIA

- Giambona A, Vinciguerra M, Cannata M, Cassarà F, Fiorentino G, Leto F, Gioco PL, Renda D, Passarello C, Maggio A., *Blood Cells Mol Dis.* 2011 Apr 15;46(4):282-7.
- Galanello and Origa, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:11
- Cao A, Galanello R., *Genet Med.* 2010 Feb;12(2):61-76.
- Amato A, Cappabianca MP, Colosimo A, Perri M, Grisanti P, Zaghis I, Ponzini D, Lerone M., *Adv Hematol.* 2010; 2010:317542.
- Rigoli L, Meo A, Miceli MR, Alessio K, Caruso RA, La Rosa MA, Salpietro DC, Ricca M, Barbieri I., *Clin Lab Haem*, 23, 373-378, 2001
- Rosatelli MC, Dozy A, Faà V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A., *Am J Hum Genet*, 50, 422-426, 1992 Feb.
- Murru S, Loudianos G, Deiana M, Camaschella C, Sciaratta GV, Agosti S, Parodi MI, Cerruti P, Cao A, Pirastu M. *Blood.* 1991 Mar 15;77(6):1342-7

PRINCIPIO DEL TEST

Il test si basa sul principio dell'ibridazione inversa su striscia, in base al quale sonde oligonucleotidiche specifiche immobilizzate su strisce di nitrocellulosa ibridano con amplificati biotinilati. La perfetta complementarità tra amplificati e sonda genera un segnale specifico, in seguito a rivelazione colorimetrica.

L'analisi comprende tre fasi successive:

1. isolamento del DNA da sangue non coagulato o da biopsie di villi coriali (fare riferimento al paragrafo *Isolamento del DNA*);
2. amplificazione simultanea ("multiplex") delle regioni target del DNA mediante primers biotinilati;
3. ibridazione su striscia degli amplificati biotinilati con sonde oligonucleotidiche allele-specifiche. Gli ibridi biotinilati sono successivamente rivelati sfruttando il legame biotina-streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina ed un appropriato substrato.

Il kit rileva le seguenti varianti:




	Mutazione	nomenclatura HGVS	tipo
1.	-101 C>T	HBB:c.-151C>T	β^+
2.	-92 C>T	HBB:c.-142C>T	β^+
3.	-87 C>G	HBB:c.-137C>G	β^+
4.	-30 T>A	HBB:c.-80T>A	β^+
5.	codone 5 -CT	HBB:c.17_18delCT	β^0
6.	codone 6 G>A (HbC)	HBB:c.19G>A	variante
7.	codone 6 A>T (HbS)	HBB:c.20A>T	variante
8.	codone 6 -A	HBB:c.20delA	β^0
9.	codone 8 -AA	HBB:c.25_26delAA	β^0
10.	codone 8/9 +G	HBB:c.27_28insG	β^0
11.	codone 30 G>C	HBB:c.92G>C	β^0
12.	IVS 1.1 G>A	HBB:c.92+1G>A	β^0
13.	IVS 1.2 T>A	HBB:c.92+2T>A	β^0
14.	IVS 1.5 G>C	HBB:c.92+5G>C	β^+
15.	IVS 1.6 T>C	HBB:c.92+6T>C	β^+
16.	IVS 1.110 G>A	HBB:c.93-21G>A	β^+
17.	IVS 1.116 T>G	HBB:c.93-15T>G	β^0
18.	IVS 1 -25	HBB:c.93-22_95del	β^0
19.	codone 39 C>T	HBB:c.118C>T	β^0
20.	codone 44 -C	HBB:c.135delC	β^0
21.	codone 76 -C	HBB:c.230delC	β^0
22.	IVS 2.1 G>A	HBB:c.315+1G>A	β^0
23.	IVS 2.654 C>T	HBB:c.316-197C>T	β^+
24.	IVS 2.745 C>G	HBB:c.316-106C>G	β^+
25.	IVS 2.844 C>G	HBB:c.316-7C>G	β^+

COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

⇒ BOX A (conservazione a -25/-15°C)

Reagenti	Codice NLM	Quantità	N° Vial
PCR Mix Soluzione contenente oligonucleotidi	KA887-n	800 µl	1

⇒ BOX B (conservazione a +2/+8°C)

Reagenti			Codice NLM	Quantità	N° Vial
Strisce Membrane di nitrocellulosa rivestita con oligonucleotidi		-	KC033-n	20	1
DNAT Soluzione denaturante contenente NaOH	 PERICOLO	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107-n	0,3 ml	1
Ibridazione (*) Soluzione salina contenente conservanti	 ATTENZIONE	H319, EUH208, P280, P305+P351+P338, P337+P313	KA102-n	48 ml	1
Lavaggio Stringente Soluzione salina contenente detergenti e conservanti	-	-	KA928-n	136 ml	1
Coniugato Soluzione contenente streptavidina marcata con fosfatasi alcalina, stabilizzanti e conservanti	-	-	KA574-n	48 ml	1
Lavaggio B Soluzione salina contenente conservanti	-	EUH208	KA105-n	136 ml	1
Sviluppatore di colore Soluzione contenente 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e 4-nitro blu di tetrazolio	-	-	AA564-n	48 ml	1
Mascherina interpretativa Foglio utilizzato per individuare le bande positive su una striscia	-	-		1	
Collector sheet Fogli da usare per l'archiviazione delle strisce; non adatto all'interpretazione dei risultati e/o alla refertazione	-	-		1	

(*) L'esenzione dalle prescrizioni in materia di etichettatura e imballaggio è stabilita per quantità e gravità di pericolo del reagente. I criteri sono: **quantità <125 ml e categorie non gravi (rif. Regolamento (CE) N°1272/2008 - elenco 1.5.2.1.1).**

⇒ I volumi dei componenti indicati precedentemente sono riferiti alla pezzatura standard del kit. Confezionamenti ridotti del kit sono disponibili su richiesta per valutazione e/o dimostrazione del prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- Tutti i reagenti chiusi o aperti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati alla temperatura indicata (**BOX A -25/-15°C; BOX B +2/+8°C**).
- Alla fine di ogni seduta riporre i reagenti alla corretta temperatura.
- Tenere il kit lontano da fonti di contaminazione quali DNA amplificato.
- Le strisce sviluppate devono essere protette dall'esposizione alla luce solare e tenute a temperatura ambiente (+15/+30°C).
- La DNAT deve essere chiusa immediatamente dopo l'uso.

PRECAUZIONI

- La procedura va eseguita da personale competente, utilizzando le buone pratiche di laboratorio ed i comuni dispositivi di protezione individuale.
- In presenza di campioni di DNA o prodotti di PCR utilizzare puntali con filtro per evitare la contaminazione delle pipette.
- Eliminare il materiale monouso utilizzato, i guanti indossati e tutti i reattivi come rifiuti speciali.
- Le vaschette possono essere riutilizzate al massimo 2 volte, se ben lavate con acqua, al termine della rivelazione.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree preposte all'esecuzione del test.
- Se vi è esposizione di occhi, cute o mucose alle sostanze utilizzate, lavare abbondantemente con acqua e contattare al più presto un medico.
- Non utilizzare reagenti scaduti.
- Le strisce non utilizzate sono stabili fino alla data di scadenza se tenute a +2/+8°C e protette dall'esposizione alla luce.
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Tenere i reagenti separati da possibili acidi nucleici contaminanti (campioni e prodotti di amplificazione).
- Si consiglia di eseguire l'analisi in tre aree separate:
 - Area 1: pre-PCR (manipolazione dei campioni ed estrazione)
 - Area 2: preparazione della Master Mix
 - Area 3: post PCR (PCR e rivelazione)
- Non utilizzare il kit se la scatola è danneggiata; contattare il fornitore.
- **E' opportuno assicurare una temperatura il più possibile costante ed uniforme in laboratorio ed evitare di posizionare gli strumenti in prossimità di fonti di calore/raffreddamento che possano comprometterne il corretto funzionamento.**
- **Utilizzare la mascherina interpretativa inserita nel lotto specifico.**
- **Indicazioni di pericolo**
 - **H314:** Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
 - **H319:** Provoca grave irritazione oculare.
- **Consigli di prudenza**
 - **P280:** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.
 - **P301+P330+P331:** IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.
 - **P303+P361+P353:** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
 - **P305+P351+P338:** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare

- **P337+P313:** Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

- **Informazioni supplementari di pericolo**

- ⇒ ○ **EUH208:** Contiene CMIT/MIT. Può provocare una reazione allergica (pelle).

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

AREA 1

- Kit di estrazione per DNA
- Cappa a flusso laminare verticale
- Set dedicato di pipette a volume variabile
- Provette da 1,5 ml e puntali con filtro monouso

AREA 2

- Cappa a flusso laminare verticale
- Set dedicato di pipette a volume variabile
- Puntali con filtro monouso
- Provette da 0,2 ml per PCR
- DNA polimerasi, tappo colore arancione

⇒ **AREA 3**

- Termociclatore validato o strumento equivalente*
- Equipaggiamento elettroforetico per gel di agarosio (opzionale)
- Puntali e pipette dedicate
- Pinzette pulite per maneggiare le strisce
- Supporti in plastica (vaschette o vassoi) per la rivelazione in manuale o automatico

Processazione manuale:

- bagnomaria con coperchio inclinato, agitazione (50-100 rpm) e programmabile a 45°C ± 0,5°C
- Termometro
- Sistema di aspirazione
- Acqua distillata o deionizzata
- Timer

Processazione automatica:

- Tecan ProfiBlot 48, Dynex Dynablot Heat o strumento equivalente.

***ATTENZIONE:** in caso di utilizzo di termociclatori differenti da quelli indicati, verificare che la velocità di rampa (riscaldamento/raffreddamento) sia ≤ 3°C/sec. Solo per il termociclatore T100 (BioRad) utilizzare una velocità di rampa pari a 4°C/sec.

PROCEDIMENTO

ISOLAMENTO DEL DNA

Estrazione manuale: cod. NLM AA1001* per estrazione di DNA da sangue intero e cod. NLM AA340** (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen), per estrazione di DNA da biopsie di villi coriali.

*AA1001: Usare solo EDTA o citrato come anticoagulanti, non eparina. E' possibile utilizzare sangue fresco o conservato a +2/+8°C per non più di 2 giorni oppure conservato a -25/-15°C. E' raccomandato l'uso di sangue congelato poiché il congelamento e lo scongelamento facilitano la lisi delle cellule rosse del sangue.

**AA340: Aggiungere a circa 10-25 mg di biopsia di villi coriali, contenuta in una eppendorf da 1,5 ml, 80 µl di PBS sterile. Mescolare bene con puntale in maniera tale da omogeneizzare il campione e se possibile degradare parzialmente la biopsia. Quindi aggiungere 100 µl di tampone di lisi ATL e procedere con lo step successivo. A seconda della quantità di biopsia di partenza risospendere in un volume finale di 50-200 µl di tampone di eluizione AE. Conservare le biopsie a -25/-15°C.

Per l'estrazione con sistemi automatici seguire le indicazioni del fornitore.

È possibile utilizzare qualunque altro tipo di estrazione che dia risultati analoghi di concentrazione e purificazione del DNA.

AMPLIFICAZIONE

Mantenere le provette e tutti i reagenti per l'amplificazione in ghiaccio durante l'esecuzione dell'intera procedura.

Evitare ripetuti scongelamenti della PCR Mix.

Preparazione Master Mix

Reagenti	Volume per campione
PCR Mix	27,8 µl
DNA polimerasi (5U/µl), tappo arancione	0,2 µl

- Preparare la Master Mix per il numero di campioni estratti + 1 volume (per $n \leq 10$) o + 2 volumi (per $n > 10$).
- Miscelare delicatamente e dispensare **28 µl** di Master Mix nelle provette da 0,2 ml precedentemente contrassegnate. Scartare la Master Mix avanzata.
- Aggiungere in ciascuna provetta **2 µl** del rispettivo DNA (**la concentrazione del DNA estratto da analizzare deve essere di circa 10-40 ng/µl**).

Nota: Campioni estratti con Maxwell (Promega) devono essere utilizzati diluiti 1:3.

Profilo termico

- Preriscaldare il coperchio del termociclatore prima di inserire le provette.
- Posizionare le provette nel termociclatore ed impostare il seguente profilo termico:

Temperatura	Tempo	Cicli
95°C	30 sec	1
95°C	30 sec	33
61°C	20 sec	
72°C	30 sec	
72°C	2 min	1
10°C	∞	

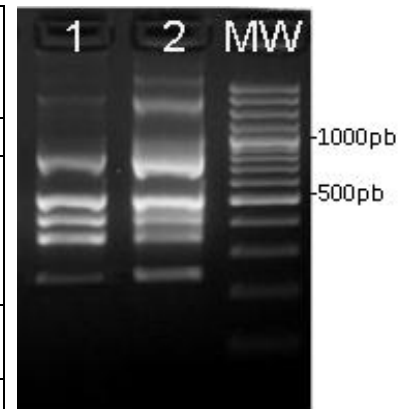
E' possibile amplificare i campioni anche utilizzando il profilo termico in uso nei kit ALFA GLOBINA TEST (cod. NLM AC099) e BETA GLOBINA PLUS TEST (cod. NLM AC104).

Mantenere gli amplificati a +2/+8°C se utilizzati in giornata, altrimenti conservarli a -25/-15°C.

Opzionale: analizzare i prodotti di amplificazione su gel di agarosio al 2% contenente un intercalante del DNA.

Nell'esempio è stato analizzato un campione (5µl) amplificato con il profilo termico specifico di AC091 (1° lane) e con il profilo di AC099/AC104 (2° lane).

Amplificati	Lunghezza amplificato (bp)
Controllo di PCR	238
-101, -92, -87, -30, codone 5, codone 6 (HbC), codone 6 (HbS), codone 6 -A, codone 8 -AA, codone 8/9 +G, codone 30, IVS 1.1, IVS 1.2, IVS 1.5, IVS 1.6	343
IVS 1.110, IVS 1.116, IVS 1-25, codone 39, codone 44, codone 76, IVS 2.1	413
IVS 2.654, IVS 2.745, IVS 2.844	506



Attenzione: è possibile osservare anche la presenza di amplificati di 770 e 1700 pb circa. La presenza o meno di queste bande non influenza il risultato su striscia.

RIVELAZIONE IN AUTOMATICO

⇒ La rivelazione può essere eseguita in automatico (ProfiBlot T48, Dynablot o strumento equivalente), richiamando il programma **COAGUL5**: in questo caso prevedere l'utilizzo di **8 µl di amplificato + 8 µl di DNAT** e 1,5 ml di ciascun reagente per ogni campione.

RIVELAZIONE IN MANUALE

- Regolare il livello dell'acqua nel bagnomaria in modo che raggiunga circa 2/3 dell'altezza della vaschetta.
 - Impostare la temperatura a **45°C** e verificare che rientri nell'intervallo indicato (45°C ± 0,5°C) utilizzando un termometro calibrato.
 - Preriscaldare l'ibridazione ed il Lavaggio Stringente a **45°C**; assicurarsi che il precipitato eventualmente presente sia completamente sciolto prima dell'utilizzo.
 - Lasciar equilibrare a temperatura ambiente il DNAT, il Coniugato, il Lavaggio B e lo Sviluppatore di colore.
 - Prelevare una striscia per ciascun campione utilizzando le pinzette (non toccare mai le strip senza guanti) e contrassegnarla utilizzando una matita (non usare penne a sfera, etc).
- Attenzione:** non far seccare le strisce durante l'intera procedura.

Ibridazione (45°C)

- Dispensare in ciascuna vaschetta del vassoio **8 µl di DNAT**.
- Attenzione:** non utilizzare il DNAT se non si presenta di colore blu.
- Per ciascun campione aggiungere **8 µl di amplificato** e miscelare bene con la pipetta: la soluzione rimarrà blu.
 - Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.
 - Aggiungere ad ogni campione **1 ml di Ibridazione** (preriscaldata a 45°C) ed agitare leggermente: il colore blu scompare.

- Immergere completamente ciascuna striscia nella lane della vaschetta contenente il rispettivo amplificato. Fare attenzione a mettere le strisce con le marker lines rivolte verso l'alto.
- Incubare per **30 minuti a 45°C** nel bagnomaria mantenendo le strisce in agitazione (50 rpm circa). Tenere il bagnomaria chiuso con un coperchio per evitare variazioni di temperatura.

Lavaggio Stringente (45°C)

- Rimuovere il vassoio dal bagnomaria; inclinarlo leggermente ed aspirare l'ibridazione utilizzando una pipetta o un sistema di aspirazione a vuoto. Aspirare il liquido cercando di non danneggiare le strisce.
- Aggiungere ad ogni campione **1 ml di Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 45°C) ed agitare a mano per qualche secondo.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml di Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 45°C).
- Incubare per **10 minuti a 45°C** nel bagnomaria in agitazione (50 rpm circa).
Attenzione: riporre il Lavaggio Stringente nel bagnomaria durante l'incubazione.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml di Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 45°C).
- Incubare per **10 minuti a 45°C** nel bagnomaria in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare la soluzione.

Sviluppo del colore (temperatura ambiente)

Tutte le successive incubazioni vengono effettuate a temperatura ambiente e con agitazione. Poiché l'acqua del bagnomaria impiega troppo tempo a scendere da 45°C alla temperatura ambiente, utilizzare la sola funzione di agitazione isolando le vaschette dall'acqua ad esempio adagiando una tavoletta di polistirolo sul coperchio del bagnomaria.

- Aggiungere **1 ml di Coniugato**.
- Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente mantenendo le strisce in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare il liquido, aggiungere **1 ml di Lavaggio B** ed agitare a mano per qualche secondo.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml di Lavaggio B**.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare ed aggiungere **1 ml di Lavaggio B**.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare ed aggiungere **1 ml di Sviluppatore di colore**.
- Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa) al riparo dalla luce.
- Aspirare e lavare le strisce diverse volte con acqua distillata.
- Lasciare asciugare bene le strisce su carta assorbente al riparo dalla luce prima di procedere con l'interpretazione dei risultati.

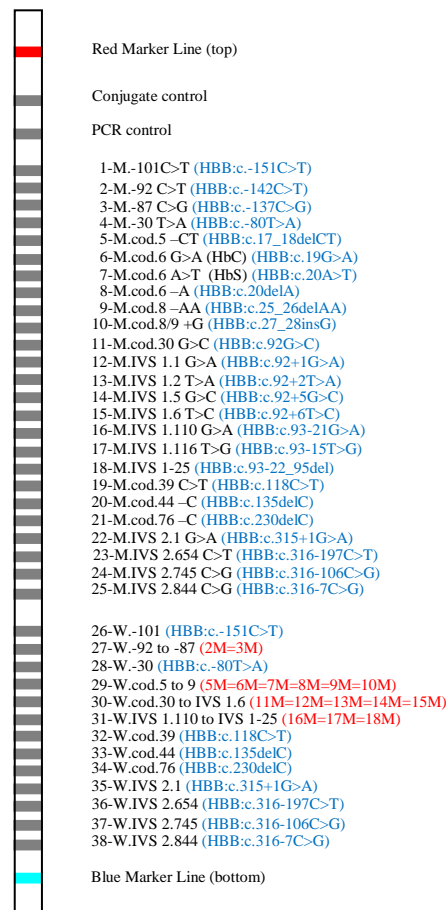
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Lo schema nella pagina seguente illustra la posizione delle diverse sonde sulla striscia. Una banda viene considerata positiva quando si colora di viola alla fine della procedura. Per determinare il genotipo di un campione, analizzare ogni striscia con l'aiuto della mascherina interpretativa. Le linee colorate (marker lines) servono da guida per il corretto allineamento tra striscia e mascherina interpretativa.

Attenzione:

- le intensità di colorazione delle diverse bande positive presenti sulla stessa striscia possono essere diverse. Questo non influisce sull'interpretazione dei risultati.
- Una reazione positiva della banda di controllo del coniugato indica il corretto funzionamento del coniugato e dello sviluppatore del colore.
- Una reazione positiva della banda del controllo di PCR indica che la reazione di PCR è avvenuta correttamente e che l'abbinamento mix- striscia è corretto.
- **La banda del controllo di rivelazione e la banda del controllo di PCR devono sempre essere presenti**

Schema striscia:



(2M=3M)= (HBB:c.-142C>T)= (HBB:c.-137C>G)
 (5M=6M=7M=8M=9M=10M)= (HBB:c.17_18delCT)=(HBB:c.19G>A)=(HBB:c.20A>T)= (HBB:c.20delA)= (HBB:c.25_26delAA)= (HBB:c.27_28insG)
 (11M=12M=13M=14M=15M)= (HBB:c.92G>C)= (HBB:c.92+1G>A)= (HBB:c.92+2T>A)= (HBB:c.92+5G>C)= (HBB:c.92+6T>C)
 (16M=17M=18M)= (HBB:c.93-21G>A)= (HBB:c.93-15T>G)= (HBB:c.93-22_95del)

Per ogni mutazione si può ottenere uno dei seguenti modelli di reattività:

- solo la sonda wild type genotipo normale (**wild type**)
- sonda wild type e sonda mutata genotipo **eterozigote**
- solo la sonda mutata genotipo **omozigote mutato**

Attenzione:

- Alcune mutazioni, poiché distanziate da pochi nucleotidi nel gene beta-globina, hanno la sonda wild type comune:

Banda	Sonda wt	Mutazioni corrispondenti
27	-92 to -87	-92 C>T; -87 C>G
29	Codone 5 to 9	Cod.5-CT; cod.6 G>A (HbC); cod.6 A>T (HbS); cod.6-A; cod.8-AA; cod.8/9+G
30	Codone 30 to IVS 1.6	Cod. 30G>C; IVS 1.1G>A; IVS 1.2 T>A; IVS 1.5 G>C; IVS 1.6 T>C
31	IVS 1.110 to IVS 1-25	IVS 1.110 G>A; IVS 1.116 T>G; IVS 1 -25

In caso di campione eterozigote per due mutazioni che risultano avere la sonda wt in comune (es: HbC + HbS), si osserva **l'assenza di segnale sulla sonda wt corrispondente**.

- Alcune mutazioni di questo kit hanno la sonda wt in comune a mutazioni del kit Beta Globina Plus Test (AC104):

Beta globina test (AC091)	Beta globina plus test (AC104)
-92 C>T, -87C>G	-86 C>A
-30 T>A	-29 A>G
cod.5 -CT, cod.6 G>A (HbC), cod.6 A>T (HbS), cod.6 -A, cod.8 -AA, cod.8/9 +G	San José
IVS2.1 G>A	Hb Camperdown

In caso di risultati omozigoti per una di queste mutazioni (segnale positivo sulla sonda mutata e assenza di segnale sulla wt corrispondente) si consiglia quindi di valutare il campione anche con il kit Beta Globina Plus Test, poiché il campione potrebbe essere un doppio eterozigote.

POSSIBILI PROBLEMI

SEGNALI FALSI NEGATIVI O ECCESSIVAMENTE DEBOLI

- Può essere stata aggiunta una quantità inadeguata di amplificato. La concentrazione dell'amplificato può essere troppo bassa in seguito ad un'amplificazione inefficiente. Segnali deboli solo sulle ultime tre bande WT possono dipendere dall'utilizzo di estratti poco puri ($OD\ 260/230 < 2.0$). In questo caso ripetere l'amplificazione utilizzando i campioni più diluiti.
- Segnali più deboli (tranne la banda del controllo di rivelazione) e reazioni falsamente negative possono essere causate da temperature troppo alte durante la fase di ibridazione e/o Lavaggio Stringente.

Controllare attentamente la temperatura del bagno termostato.

- L'Ibridazione ed il Lavaggio Stringente non sono stati scaldati o miscelati adeguatamente. In questo caso le soluzioni rimanenti nei flaconi devono essere eliminate. Ripetere il test usando soluzioni nuove.
- L'assenza di segnale sulla banda del controllo di PCR può indicare che il campione non si è amplificato (assenza di segnale sulle bande del gene HBB) oppure un abbinamento scorretto mix/striscia: è stato rivelato un amplificato ottenuto con kit BETA GLOBINA TEST PLUS (cod. NLM AC104) sulle strisce del kit BETA GLOBINA TEST (cod. NLM AC091). In questo caso è presente un segnale sulle bande del gene HBB. Ripetere lo step di rivelazione

SEGNALI FALSI POSITIVI

- Si possono ottenere segnali aspecifici sulla striscia se la temperatura durante la fase di Ibridazione e/o Lavaggio Stringente è troppo bassa.

Controllare attentamente la temperatura del bagno termostato.

- L'Ibridazione ed il Lavaggio Stringente non sono stati scaldati o miscelati adeguatamente. In questo caso le soluzioni rimanenti nei flaconi devono essere eliminate. Ripetere il test usando soluzioni nuove.
- Il livello dell'acqua nel bagnomaria è troppo basso: assicurarsi che tale livello raggiunga 2/3 dell'altezza della vaschetta.
- Il coperchio del bagnomaria non è stato tenuto chiuso adeguatamente. Assicurarsi della corretta chiusura del coperchio durante le fasi a temperatura controllata
- Il Lavaggio Stringente non è alla corretta temperatura: ricordarsi di riporre il Lavaggio Stringente nel bagnomaria durante le incubazioni a **45°C**
- In presenza di un campione con la mutazione cod.8/9+G si potrebbe riscontrare un lieve segnale anche sulla sonda mutata cod.8-AA.

COLORAZIONE DISOMOGENEA DELLA SINGOLA BANDA

La velocità di agitazione durante la rivelazione è troppo bassa. Assicurarsi che le strisce siano completamente immerse nel liquido.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit "BETA GLOBINA TEST" è stata valutata analizzando 112 campioni di DNA positivi per le mutazioni indagate dal kit. Sono stati utilizzati 100 campioni di DNA ottenuti da sangue intero o villi coriali e 12 campioni sintetici.

Il kit ha permesso di discriminarli in maniera corretta, pertanto la sensibilità diagnostica è pari al 100%.

N° campioni	Mutazione	Nomenclatura HGVS
3	-101 C>T	HBB:c.-151C>T
3	-92 C>T	HBB:c.-142C>T
7	-87 C>G	HBB:c.-137C>G
2	-30 T>A	HBB:c.-80T>A
5	codone 5 -CT	HBB:c.17_18delCT
6	codone 6 G>A (HbC)	HBB:c.19G>A
13	codone 6 A>T (HbS)	HBB:c.20A>T
5	codone 6 -A	HBB:c.20delA
6	codone 8 -AA	HBB:c.25_26delAA
5	codone 8/9 +G	HBB:c.27_28insG
3	codone 30 G>C	HBB:c.92G>C
5	IVS 1.1 G>A	HBB:c.92+1G>A
2	IVS 1.2 T>A	HBB:c.92+2T>A
3	IVS 1.5 G>C	HBB:c.92+5G>C
6	IVS 1.6 T>C	HBB:c.92+6T>C
7	IVS 1.110 G>A	HBB:c.93-21G>A
1	IVS 1.116 T>G	HBB:c.93-15T>G
3	IVS 1 -25	HBB:c.93-22_95del
10	codone 39 C>T	HBB:c.118C>T
4	codone 44 -C	HBB:c.135delC
5	codone 76 -C	HBB:c.230delC
5	IVS 2.1 G>A	HBB:c.315+1G>A
5	IVS 2.654 C>T	HBB:c.316-197C>T
4	IVS 2.745 C>G	HBB:c.316-106C>G
3	IVS 2.844 C>G	HBB:c.316-7C>G

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit "BETA GLOBINA TEST", espressa come la quantità minima di marcatore bersaglio che può essere esattamente rilevata, è pari a 7 ng/µl di DNA.

Specificità diagnostica

La specificità del kit "BETA GLOBINA TEST" è stata determinata analizzando 122 campioni. Non sono stati ottenuti risultati falsi positivi. In accordo con tali dati la specificità del kit è pari al 100%.

Cross-Reattività delle sonde

Sono stati analizzati anche campioni positivi per alcune mutazioni del gene HBB localizzate in prossimità delle varianti indagate dal kit "BETA GLOBINA TEST": HBB:c.92+2T>G, HBB:c.92+2T>C, HBB:c.92+5G>A, HBB:c.107A>T, HBB:c.93-21_96del.

Nessuno di questi campioni ha mostrato cross-reattività con le sonde presenti sulla striscia.

Riproducibilità

INTRASAGGIO

La riproducibilità Intrasaggio è stata valutata analizzando 3 campioni in almeno 2 replicati.

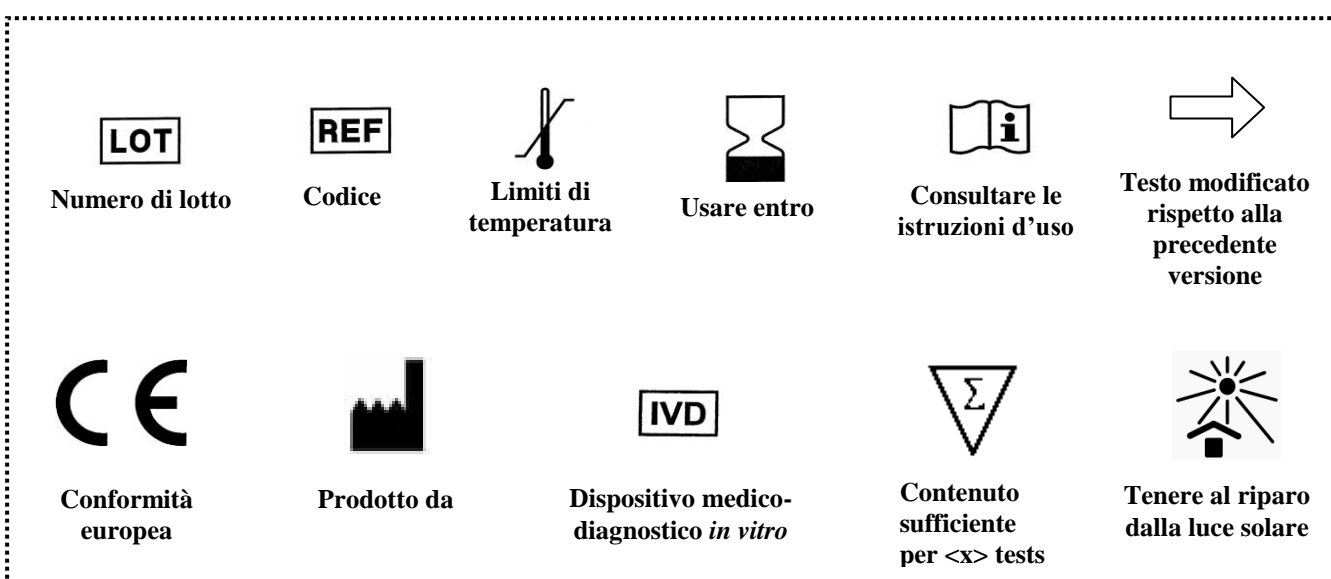
INTERSAGGIO

La riproducibilità intersaggio è stata testata analizzando 2 campioni in 3 sedute indipendenti tra loro. La rivelazione è stata fatta in automatico e in manuale.

I test sono stati eseguiti secondo quanto descritto in metodica e la riproducibilità è stata del 100%

ATTENZIONE

Come per ogni sistema basato su amplificazione e rilevazione degli acidi nucleici è possibile che la presenza di varianti ignote nelle sequenze geniche della regione in cui sono stati disegnati i primer e/o le sonde specifiche possa dare risultati inattesi.



Instructions for Use

ver. 5 - 15/04/2022

Molecular Biology

BETA GLOBIN TEST

REF

AC091

CE



20 TEST

GMDN

59804

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

HEADQUARTER: Via Cascina Conighetto – BUSINESS OFFICES: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALY

Phone: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

ISO 9001 Quality Management System Organization certified and ISO 13485 Medical Sector Quality Management System certified (IMQ certification body - CSQ certification).

INTENDED USE

The **AC091** device provides reagents for the identification of 25 mutations of beta-globin gene (**HBB**), involved in type beta thalassemia, through the amplification of the target sequences, reverse-hybridization and color development.

Amplification enzyme assigned: **orange** cap NLM code BA092, followed by size indication, which could change depending on enzyme quantity supplied (i.e.: BA092/50, BA092/60, etc).

This device has been validated with:

- a) manual column-based extraction (NLM code AA1001) starting from fresh blood, NLM code AA340 (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) for DNA extraction from chorionic villus samples and with the most common automatic systems for nucleic acids purification.
- ⇒ b) PTC 100 (MJ Research); Veriti®, 2720 and GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems); Mastercycler ep gradient S (Eppendorf); T100 (BioRad) thermal cycler instruments
- ⇒ c) automatic detection instruments: Tecan ProfiBlot 48 and Dynex Dynablot Heat

INTRODUCTION

Beta thalassemias are an heterogeneous group of hereditary autosomal recessive blood disorders resulting in variable phenotypes. They are caused by a reduced (beta +) or absent (beta 0) synthesis of the beta-globin chains of the hemoglobin tetramer, due to alterations in beta-globin gene (HBB) on chromosome 11.

The majority of mutations are single nucleotide substitutions, deletions, or insertions of oligonucleotides leading to frameshift. Rarely, beta-thalassemia results from gross gene deletion.

Three clinical and hematological conditions of increasing severity are recognized: thalassemia minor (the beta-thalassemia carrier state), thalassemia intermedia, and thalassemia major.

The beta-thalassemia carrier state, as a result of heterozygous mutation of beta-globin gene, is clinically asymptomatic and is defined by specific hematological features. Thalassemia major is a severe transfusion-dependent anemia. Thalassemia intermedia comprehend a clinically and genotypically very heterogeneous group of thalassemia-like disorders, ranging in severity from the asymptomatic carrier state to the severe transfusion-dependent type.

Particularly diffused in Italy and in Mediterranean area, the total annual incidence of symptomatic individuals is estimated at 1 in 100000 throughout the world and 1 in 10000 people in the European Union.

REFERENCES

- Giambona A, Vinciguerra M, Cannata M, Cassarà F, Fiorentino G, Leto F, Gioco PL, Renda D, Passarello C, Maggio A., *Blood Cells Mol Dis.* 2011 Apr 15;46(4):282-7.
- Galanello and Origa, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:11
- Cao A, Galanello R., *Genet Med.* 2010 Feb;12(2):61-76.
- Amato A, Cappabianca MP, Colosimo A, Perri M, Grisanti P, Zaghis I, Ponzini D, Lerone M., *Adv Hematol.* 2010; 2010:317542.
- Rigoli L, Meo A, Miceli MR, Alessio K, Caruso RA, La Rosa MA, Salpietro DC, Ricca M, Barbieri I., *Clin Lab Haem*, 23, 373-378, 2001
- Rosatelli MC, Dozy A, Faà V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A., *Am J Hum Genet*, 50, 422-426, 1992 Feb.
- Murru S, Loudianos G, Deiana M, Camaschella C, Sciaratta GV, Agosti S, Parodi MI, Cerruti P, Cao A, Pirastu M. *Blood.* 1991 Mar 15;77(6):1342-7

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The test is based on the reverse-hybridization principle, where specific oligonucleotide probes immobilized as parallel lines on membrane-based strips hybridize with biotinylated PCR products. The exact match between probes and amplified product generates a signal exploiting the bond between biotin and streptavidin conjugated with alkaline phosphatase and a subsequent color developer.

The analysis consists of three steps:

1. DNA extraction from non-coagulated blood or chorionic villus using extraction kit (see the procedure in the following *DNA Extraction* paragraph);
2. Multiplex PCR of target DNA sequences using biotinylated primers;
3. Hybridization of the amplification products with the oligonucleotide probes and colorimetric detection.

The device allows simultaneous detection of the following variations:




	Mutation	HGVS nomenclature	Category
1.	-101 C>T	HBB:c.-151C>T	β^+
2.	-92 C>T	HBB:c.-142C>T	β^+
3.	-87 C>G	HBB:c.-137C>G	β^+
4.	-30 T>A	HBB:c.-80T>A	β^+
5.	codon 5 –CT	HBB:c.17_18delCT	β^0
6.	codon 6 G>A (HbC)	HBB:c.19G>A	Hb variants
7.	codon 6 A>T (HbS)	HBB:c.20A>T	Hb variants
8.	codon 6 –A	HBB:c.20delA	β^0
9.	codon 8 –AA	HBB:c.25_26delAA	β^0
10.	codon 8/9 +G	HBB:c.27_28insG	β^0
11.	codon 30 G>C	HBB:c.92G>C	β^0
12.	IVS 1.1 G>A	HBB:c.92+1G>A	β^0
13.	IVS 1.2 T>A	HBB:c.92+2T>A	β^0
14.	IVS 1.5 G>C	HBB:c.92+5G>C	β^+
15.	IVS 1.6 T>C	HBB:c.92+6T>C	β^+
16.	IVS 1.110 G>A	HBB:c.93-21G>A	β^+
17.	IVS 1.116 T>G	HBB:c.93-15T>G	β^0
18.	IVS 1 -25	HBB:c.93-22_95del	β^0
19.	codon 39 C>T	HBB:c.118C>T	β^0
20.	codon 44 –C	HBB:c.135delC	β^0
21.	codon 76 –C	HBB:c.230delC	β^0
22.	IVS 2.1 G>A	HBB:c.315+1G>A	β^0
23.	IVS 2.654 C>T	HBB:c.316-197C>T	β^+
24.	IVS 2.745 C>G	HBB:c.316-106C>G	β^+
25.	IVS 2.844 C>G	HBB:c.316-7C>G	β^+

PRODUCT COMPOSITION

⇒ BOX A (store at -25/-15°C)

Reagents	NLM Code	Quantity	N° Vial
PCR Mix Solution containing oligonucleotides	KA887-n	800 µl	1

⇒ BOX B (store at +2/+8°C)

Reagents			NLM Code	Quantity	N° Vial
Strips Nitrocellulose membranes coated with oligonucleotides		-	KC033-n	20	1
DNAT Denaturation solution containing NaOH	 DANGER	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107-n	0,3 ml	1
Hybridization (*) Saline Solution containing preservatives	 WARNING	H319, EUH208, P280, P305+P351+P338, P337+P313	KA102-n	48 ml	1
Stringent Wash Solution Saline solution containing detergent ad preservatives	-	-	KA928-n	136 ml	1
Conjugate Solution containing streptavidin labeled with alkaline phosphatase, stabilizers and preservatives	-	-	KA574-n	48 ml	1
Wash Solution B Saline Solution containing preservatives	-	EUH208	KA105-n	136 ml	1
Color developer Solution containing 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and 4-Nitroblue tetrazolium	-	-	AA564-n	48 ml	1
Transparent interpretation card	-	-		1	
Collector sheet For strip storage, not suitable for results interpretation and/or as medical report	-	-		1	

(*) The exemption from the requirements for labeling and packaging is determined by quantity and severity of danger reagent. The criteria are: **amounts <125 ml and categories not serious (ref. Regulation (EC) N° 1272/2008 - list 1.5.2.1.1).**

⇒ The components volume show above refer to the standard size of the kit. Reduced packages of the kit are available on request for evaluation and / or demonstration of the product.

STABILITY AND STORAGE

- All opened or unopened reagents are stable up to the expiry date indicated on the label when stored at the correct temperature (**BOX A -25/-15°C; BOX B +2/+8°C**).
- At the end of each assay store reagents at the appropriate temperature.
- The kit should be kept isolated from any source of contaminating DNA, especially amplified products.
- Developed dry strips should be stored in the dark at room temperature (+15/+30°C).
- The vial containing the DNAT should be closed immediately after use.

PRECAUTIONS

- Only professional and opportunely trained personnel should use this kit. Handle this product according to established good laboratory practices and universal precautions; wear personal protective apparel.
- When handling DNA samples or amplification products, use aerosol-resistant pipette tips to avoid pipettes contamination.
- Discard used materials as bio hazardous waste.
- Plastic trays can be reused maximum twice, if washed with water at the end of detection.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in areas where reagents or specimens are handled.
- If skin or mucous membrane exposure occurs, immediately wash the area with copious amount of water. Seek medical advice.
- Do not use components beyond the expiration date.
- Test strips stored at +2/+8°C in the dark are stable until the expiry date.
- Do not mix reagents from different lots.
- Reagents have to be preserved separated from possible contaminants (as DNA samples and amplification products).
- It is recommended to work in three separated areas:
 - Area 1: pre-PCR (samples handling and extraction).
 - Area 2: Master Mix preparation.
 - Area 3: post-PCR (amplification and detection).
- Don't use the device if the box is damaged; contact the supplier.
- **It is advisable to have constant and uniform laboratory temperature, avoid to place the instruments near heating/cooling sources that may compromise the correct working.**
- **Use the transparent interpretation card of the specific lot.**
- **Hazard statements**
 - **H314:** Causes severe skin burns and eye damage.
 - **H319:** Causes serious eye irritation.
- **Precautionary statements**
 - **P280:** Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 - **P301+P330+P331:** IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
 - **P303+P361+P353:** IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated

clothing. Rinse skin with water/shower.

- **P305+P351+P338:** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing
- **P337+P313:** If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

- **Supplemental hazard informations**

- 
- **EUH208:** It contains CMIT/MIT. May cause allergic reaction (skin).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

AREA 1

- DNA Extraction Kit
- Vertical downflow air box
- Dedicated adjustable volume pipettes set
- Aerosol-resistant pipettes tips and 1,5 ml tubes

AREA 2

- Vertical downflow air box
- Dedicated adjustable volume pipettes set
- Aerosol-resistant pipettes tips
- 0,2 ml PCR tubes
- DNA polymerase with orange cap



AREA 3

- Validated thermal cycler or equivalent instrument*
- Agarose gel electrophoresis equipment (optional)
- Dedicated adjustable volume pipettes set and tips
- Clean tweezers to handle strips
- Plastic supports (trays) for manual or automatic detection

Manual strip processing:

- Water bath with inclined lid, shaking platform (50-100 rpm) and adjustable temperature (45 ± 0,5 °C)
- Thermometer
- Vacuum aspiration apparatus
- Deionized or distilled water
- Timer

Automatic strip processing:

- Tecan ProfiBlot 48, Dynex Dynablot Heat or equivalent instrument.

* **WARNING:** if thermal cyclers different from those mentioned above are used, verify that the ramp rate (heating/cooling) is $\leq 3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. Only for T100 (BioRad) the ramp rate is $4^{\circ}\text{C}/\text{sec}$.

PROCEDURE

DNA EXTRACTION

Manual purification: NLM code AA1001* for DNA extraction from blood samples and AA340** (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) for DNA extraction from chorionic villus samples.

* AA1001: Use EDTA or citrate only as anticoagulant, do not use heparin. It is possible to use fresh blood, blood stored at +2/+8°C for no more than 2 days or stored at -25/-15°C for longer storage periods. The use of frozen blood is recommended since freezing and thawing enhance blood cells lysis.

** AA340: Add about 80µl of sterile PBS to 10-25 mg of chorionic villus biopsy, contained in a 1.5 ml eppendorf. Mix well with the tip in order to homogenize the sample, and, if possible, to partially degrade the biopsy. Then add 100 µl of ATL lysis buffer and proceed to the next step. Depending on the amount of starting biopsy resuspend in a final volume of 50-200 µl of AE elution buffer. Keep biopsies -25/-15°C.

For extraction with automatic systems follow the specific manufacturer's IFUs.

Any other type of DNA extraction with similar results of concentration and purification can be used.

AMPLIFICATION

Keep all the reagents for the amplification on ice during the execution of the whole procedure.

Avoid repeated freeze-thaw cycles of the PCR Mix.

Master Mix preparation

Reagents	Volume/sample
PCR Mix	27,8 µl
DNA polymerase (5U/µl), orange cap	0,2 µl

- Prepare the Master Mix for the number of samples extracted + 1 more volume (if "n" ≤ 10) or + 2 more volumes (if "n" >10).
- Mix gently and dispense **28 µl** of Master Mix in the previously marked 0,2 ml test tubes. Discard the remaining Master Mix.
- Add **2 µl** of extracted DNA to each tube and mix pipetting up and down (**DNA concentration to be used should be 10-40 ng/µl**).

Note: Always dilute 1:3 sample obtained with Maxwell (Promega) before use.

Amplification program

- Preheat the thermal cycler lid.
- Put reaction tubes in the thermal cycler and run the following amplification program:

Temperature	Time	Cycles
95°C	30 sec	1
95°C	30 sec	33
61°C	20 sec	
72°C	30 sec	
72°C	2 min	1
10°C	∞	

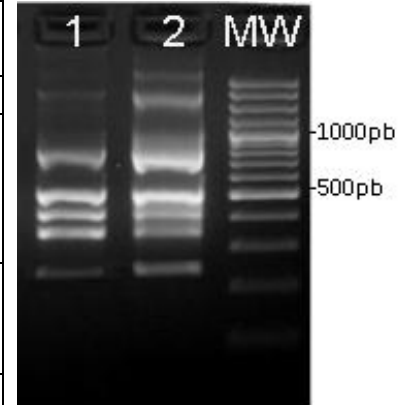
It's also possible to amplify the samples using the amplification program of ALPHA GLOBIN TEST (NLM code AC099) and BETA GLOBIN PLUS TEST (NLM code AC104).

Keep PCR products at + 2/+8°C if detection is done in the same day, or store them at -25/-15°C.

Optional: analyze amplification products by 2% agarose gel containing an DNA intercalating agent.

In the example below 5µl of a sample amplified with AC091 amplification program (1st lane) and AC099/AC104 amplification program (2nd lane) has been analyzed.

PCR products	PCR product length (pb)
PCR control	238
-101, -92, -87, -30, codon 5, codon 6 (HbC), codon 6 (HbS), codon 6 –A, codon 8 –AA, codon 8/9 +G, codon 30, IVS 1.1, IVS 1.2, IVS 1.5, IVS 1.6	343
IVS 1.110, IVS 1.116, IVS 1-25, codon 39, codon 44, codon 76, IVS 2.1	413
IVS 2.654, IVS 2.745, IVS 2.844	506



Note: You can also observe amplification products of approximately 770 and 1700 bp. The possible presence of these bands does not affect the results.

AUTOMATIC DETECTION

⇒ Detection can be performed by using automatic instrument (ProfiBlot T48, Dynablot or similar instrument): select the **COAGUL 5** program. In this case **8 µl PCR product + 8 µl DNAT** and 1,5 ml of each reagent should be used for each sample.

MANUAL DETECTION

- Adjust the water level of the shaking bath to approx. 2/3 of the height of the Plastic Tray.
- Heat the water bath to **45°C** and check the temperature ($45 \pm 0,5^\circ\text{C}$) using a calibrated thermometer.
- Pre-warm the Hybridization and Stringent Wash Solution to **45°C**; all crystals should be completely dissolved.
- Allow DNAT, Conjugate, Wash Solution B and Color developer to reach room temperature.
- Remove one strip for each sample using clean tweezers (touch strips with gloves only). Label strips with a pencil (do not use ballpoint pen, markers, etc).

Warning: do not allow the strips to dry during the whole procedure.

Hybridization (45°C)

- Pipette **8 µl** of **DNAT** into each lane of the Plastic Tray
Warning: do not use DNAT if is not blue.
- For each sample add **8 µl** of **amplification** product to the corresponding drop of DNAT. Mix thoroughly with a pipette (solution will remain blue).
- Incubate **5 min** at room temperature.
- Add **1 ml** of **Hybridization** (pre-warmed to 45°C) to each sample and mix gently: blue color disappears.
- Place strips into the respective lanes with marker lines facing up. Submerge completely.

- Incubate for **30 min** at **45°C** in the shaking water bath (about 50 rpm). Keep the water bath closed to avoid temperature variations.

Stringent Wash solution (45°C)

- After hybridization step remove the tray from the water bath; angle the tray upwards and aspirate the solution from each lane using a pipette or a vacuum aspiration apparatus, without touching the strip surface to avoid its damage.
- Add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 45°C) to each lane and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 45°C).
- Incubate **10 min** at **45°C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
Warning: put Stringent Wash solution back in the water bath during incubation
- Remove the solution and add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 45°C).
- Incubate **10 min** at **45°C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
- Remove the solution from each lane.

Color development (room temperature)

All the next steps have to be performed at room temperature with shaking. Since water takes too much time to reach room temperature, place a tray (for example of polystyrene) on the lid of the water bath to isolate the Plastic Trays from the hot water and use the agitation function of the water bath only.

- Add **1 ml** of **Conjugate**.
- Incubate **20 minutes** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution, add **1 ml** of **Wash solution B** and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Wash solution B**.
- Incubate for **5 min** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Wash solution B**.
- Incubate for **5 min** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Color developer**.
- Incubate for **20 min** in the dark, while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove color developer and wash strips with distilled water.
- Let strips dry in the dark on absorbent paper before proceeding with the interpretation of results.

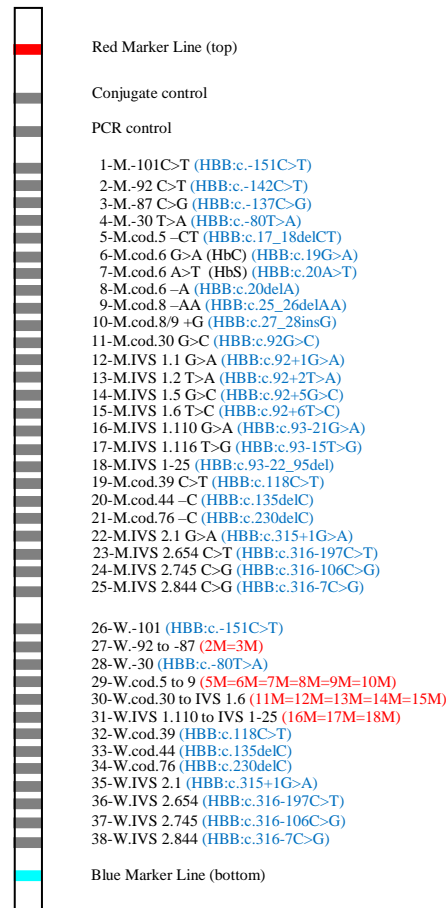
RESULTS INTERPRETATION

The strip scheme on the next page shows the position of the different probes on the strip. A line is considered positive when a purple band appears at the end of the detection. To identify the genotype of a sample analyze each strip with the help of the transparent interpretation card. In order to correctly align strip and transparent interpretation card, colored marker lines on the top and on the bottom have to be used.

Warning:

- the color intensity could be different between different bands on the same strip but this doesn't affect the interpretation of the results.
- The Conjugate control line (the upper one) indicates the correct reaction of both conjugate and color developer.
- A positive reaction of the PCR control line (the second one) indicates the PCR reaction was successful
- **Both Conjugate control and PCR control lines always have to stain positive**

Strip scheme



(2M=3M)= (HBB:c.-142C>T)= (HBB:c.-137C>G)
(5M=6M=7M=8M=9M=10M)= (HBB:c.17_18delCT)= (HBB:c.19G>A)= (HBB:c.20A>T)= (HBB:c.20delA)= (HBB:c.25_26delAA)= (HBB:c.27_28insG)
(11M=12M=13M=14M=15M)= (HBB:c.92G>C)= (HBB:c.92+1G>A)= (HBB:c.92+2T>A)= (HBB:c.92+5G>C)= (HBB:c.92+6T>C)
(16M=17M=18M)= (HBB:c.93-21G>A)= (HBB:c.93-15T>G)= (HBB:c.93-22_95del)

For each mutation one of the following patterns should be obtained:

- Only wild type line Normal genotype (**wild type**)
- Wild Type and Mutant lines **Heterozygous** genotype
- Only mutant line **Homozygous mutant** genotype

Warning:

- Some mutations, because are very close each other on beta-globin gene, share the same wild type probe:

Line	Wt probe	Corresponding mutation
27	-92 to -87	-92 C>T; -87 C>G
29	Codon 5 to 9	Cod.5-CT; cod.6 G>A (HbC); cod.6 A>T (HbS); cod.6-A; cod.8-AA; cod.8/9+G
30	Codon 30 to IVS 1.6	Cod. 30G>C; IVS 1.1G>A; IVS 1.2 T>A; IVS 1.5 G>C; IVS 1.6 T>C
31	IVS 1.110 to IVS 1-25	IVS 1.110 G>A; IVS 1.116 T>G; IVS 1 -25

In case of sample with heterozygous genotype for two mutations sharing the same wt probe (e.g. HbC + HbS), there is **no signal on the corresponding wt probe**.

- Some mutations share the same wild type probe with mutations investigated in Beta Globin Plus test (cod. NLM AC104)

Beta globin test (AC091)	Beta globin plus test (AC104)
-92 C>T, -87C>G	-86 C>A
-30 T>A	-29 A>G
cod.5 -CT, cod.6 G>A (HbC), cod.6 A>T (HbS), cod.6 -A, cod.8 -AA, cod.8/9+G	San José
IVS2.1 G>A	Hb Camperdown

In case of homozygous results for one of these mutations (positive signal on mutant line and no signal on wild type line), we suggest to test the sample also with Beta Globina Plus Test, because the sample could be a double heterozygous.

TROUBLESHOOTING

FALSE NEGATIVE OR LOW SIGNALS

- A wrong amount of amplification product has been used. PCR products concentration could be too low due to an inefficient amplification.
- Weak signals only on the last three wild type probes may result from the use of not pure extracts (OD 260/230 <2.0). In this case, repeat amplification using the samples more diluted.
- Low signals (except Control Line) and false negative results could be caused by too high temperature during hybridization and/or Stringent Wash Solution steps.

Check carefully water bath temperature

- Hybridization and Stringent Wash Solution have not been well pre-warmed or mixed. Discard remaining reagents and repeat tests with new solutions.
- The absence of signal on the PCR control band may indicate that the sample was not amplified (absence of signal on all the line of HBB gene) or a incorrect combination mix / strip: it has been revealed an amplified sample obtained with BETA GLOBIN TEST PLUS (NLM code AC104) on the strips of the BETA GLOBIN TEST (NLM code AC091). In this case, a signal is present on the bands of the HBB gene. Repeat the detection step.

FALSE POSITIVE SIGNALS

- Non-specific signals could be caused by too low temperature during hybridization and/or Stringent Wash Solution step

Check carefully water bath temperature

- Hybridization and Stringent Wash Solution have not been well pre-warmed or mixed. Discard remaining reagents and repeat tests with new solutions.
- Water level of the water bath is too low: be sure that level reaches approximately 2/3 of the height of the Plastic Tray.
- Check carefully the water bath lid during the Hybridization or Stringent Wash Solution, keep it closed.
- Keep Stringent Wash Solution in the water bath during the incubation steps at **45°C**
- In the presence of a sample that carries the cod.8/9+G mutation it is possible to have a slight signal also on the mutated cod.8-AA probe.

SINGLE LINE UNHOMOGENEOUS COLORATION

Shaking rate during detection steps is too low. Check that strips are totally submerged.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity of the kit "BETA GLOBIN TEST" was assessed by analyzing 112 DNA samples positive for the mutations investigated by the kit. We used 100 samples of DNA obtained from whole blood or chorionic villus and 12 synthetic samples.

All the samples were correctly genotyped, resulting in a diagnostic sensitivity of 100%.

Nr samples	Mutation	HGVS nomenclature
3	-101 C>T	HBB:c.-151C>T
3	-92 C>T	HBB:c.-142C>T
7	-87 C>G	HBB:c.-137C>G
2	-30 T>A	HBB:c.-80T>A
5	codon 5 -CT	HBB:c.17_18delCT
6	codon 6 G>A (HbC)	HBB:c.19G>A
13	codon 6 A>T (HbS)	HBB:c.20A>T
5	codon 6 -A	HBB:c.20delA
6	codon 8 -AA	HBB:c.25_26delAA
5	codon 8/9 +G	HBB:c.27_28insG
3	codon 30 G>C	HBB:c.92G>C
5	IVS 1.1 G>A	HBB:c.92+1G>A
2	IVS 1.2 T>A	HBB:c.92+2T>A
3	IVS 1.5 G>C	HBB:c.92+5G>C
6	IVS 1.6 T>C	HBB:c.92+6T>C
7	IVS 1.110 G>A	HBB:c.93-21G>A
1	IVS 1.116 T>G	HBB:c.93-15T>G
3	IVS 1 -25	HBB:c.93-22_95del
10	codon 39 C>T	HBB:c.118C>T
4	codon 44 -C	HBB:c.135delC
5	codon 76 -C	HBB:c.230delC
5	IVS 2.1 G>A	HBB:c.315+1G>A
5	IVS 2.654 C>T	HBB:c.316-197C>T
4	IVS 2.745 C>G	HBB:c.316-106C>G
3	IVS 2.844 C>G	HBB:c.316-7C>G

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the kit "BETA GLOBIN TEST", expressed as the minimum quantity of the target that can be detected, is equal to 7 ng/μl DNA.

Diagnostic specificity

The specificity was determined by analyzing 122 samples. No false positive results were obtained.

In agreement with these data the specificity of the kit is 100%.

Cross- reactivity of the probes

We also analyzed samples carrying mutations of the HBB gene located near the variants investigated by the kit: HBB:c.92+2T>G, HBB:c.92+2T>C, HBB:c.92+5G>A, HBB:c.107A>T, HBB:c.93-21_96del.

None of these samples showed cross-reactivity with the probes on the strip.

Reproducibility

INTRA-ASSAY

The intra-assay reproducibility was assessed by analyzing at least 3 samples in 2 replicates.

INTER-ASSAY

The reproducibility was tested by analyzing intersaggio 2 samples in 3 independent seats between them. The revelation was made in automatic and manual.

The tests were performed as described in the instructions for use and the reproducibility was 100 %

WARNING

As every system based on amplification and detection of nucleic acids, it is possible to have unexpected results in the presence of unknown genetic mutation in the primer and/or probe specific target regions.

