

Istruzioni d'uso

ver. 10 - 14/04/2022

Biologia Molecolare

ALFA GLOBINA TEST

REF

AC099

CE



10 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 Alfa Globina Test fornisce il materiale necessario per l'identificazione di 22 alterazioni del gene alfa-globina coinvolte nelle talassemie di tipo alfa, mediante amplificazione delle sequenze bersaglio, ibridazione inversa su striscia e successiva rivelazione colorimetrica.

Nel kit è inclusa una provetta di **Enzyme mix-AC099** contenente:

- l'enzima di amplificazione
- l'enzima UNG (Uracil-DNA Glycosylase) che serve per prevenire la contaminazione da amplificati.

Il presente dispositivo è stato validato con:

- a) il kit di estrazione manuale su colonnina (cod. NLM AA1001) e con i più comuni sistemi automatici di estrazione degli acidi nucleici
- b) i termociclatori: PTC 100 (MJ Research); GeneAmp® 9700, AB2720, Veriti e SimpliAmp (Applied Biosystems); Mastercycler ep gradient S (Eppendorf); T100 (BioRad).
- c) strumenti automatici di rivelazione: Tecan ProfiBlot 48 e Dynex Dynablot Heat



INTRODUZIONE

L'alfa-talassemia è una patologia caratterizzata da un difetto di sintesi delle catene α globiniche, originariamente endemica delle regioni malariche (in Italia, era diffusa soprattutto nelle regioni meridionali, nelle isole maggiori e nel delta padano). Le recenti migrazioni globali da queste aree hanno però ormai diffuso la malattia in tutto il mondo.

Poiché i geni α -globina sono quattro (due per ciascun allele situati sul braccio corto del cromosoma 16), la patologia si presenta notevolmente eterogenea e complessa.

In particolare, si distinguono quattro diverse categorie di α -talassemia:

- α^+ talassemia ($-\alpha/\alpha$) in cui uno solo gene alfa è inattivato
- α^0 talassemia in cui sono inattivati in cis ($--/\alpha$) o in trans ($-\alpha/-\alpha$) due geni alfa
- malattia da HbH in cui tre dei quattro geni alfa globinici sono assenti ($--/-\alpha$) con una conseguente anemia emolitica cronica, splenomegalia ed una riduzione della sopravvivenza dei globuli rossi
- idrope fetale di Bart ($--/--$) dovuta alla delezione di tutti e quattro i geni globinici. I feti affetti da tale patologia muoiono in utero o appena dopo la nascita.

Sebbene individui con tre geni α funzionali ($-\alpha/\alpha$) siano clinicamente ed ematologicamente silenti e i portatori di alfa talassemia ($-\alpha/-\alpha$ o $--/\alpha$) risultino avere una lieve anemia ipocromica microcitica, le coppie con questi genotipi sono a rischio di avere un figlio affetto da idrope di Bart o che sviluppi la patologia HbH.

Per una corretta gestione clinica dei pazienti, il risultato ottenuto in seguito all'utilizzo del presente kit deve essere sempre associato ad altri parametri di laboratorio ed al quadro clinico del paziente stesso.

BIBLIOGRAFIA

- Fortina, Dianzani, Serra, Gottardi, Saglio, Farinasso, Piga, Gabutti, Camaschella, *British Journal of Haematology* 1991; 78: 529-534
- Oron-Karni, Filon, Oppenheim and Rund, *American Journal of Hematology* 1998; 58: 306-310
- Liu, Old, Miles, Fisher, Weatherall and Clegg, *British Journal of Haematology* 2000; 108: 295-299
- Samuel S. Chong, Corinne D. Boehm, Douglas R. Higgs, and Garry R. Cutting, *Blood*, 1 Jan 2000 Vol 95
- Arnold S.-C. Tan, Thuan C. Quah, Poh S. Low and Samuel S. Chong, *Blood* 2001; 98: 250-251
- Neishabury, Abbasi-Moheb, Poorfathollah, *Arch Irrn Med* 2001; 4 (4):160-164
- Foglietta, Bianco, Maggio, and Giambona, *American Journal of Hematology* 2003; 74:191-195
- David H. K. Chui, Suthat Fucharoen and Vivian Chan, *Blood* 2003; 101: 791-800

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 (fare riferimento al paragrafo *Isolamento del DNA*);
2. amplificazione simultanea ("multiplex") delle regioni target del DNA mediante primer 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:

Strip A

	NOMENCLATURE HGVS *
-3.7 (tipo I)	NG_000006.1:g.34164_37967del3804
-4.2	-
-20.5	NG_000006.1:g.15164_37864del22701
--MED	NG_000006.1:g.24664_41064del16401
--SEA	NG_000006.1:g.26264_45564del19301
--FIL	NG_000006.1:g.11684_43534del31851
--CAL	NG_000006.1:g.8464_40664del32201
α1 cd 14 G>A	HBA1:c.44G>A
α1 cd 59 Hb Adana	HBA1:c.179G>A
α1 cd 47 Hb Hasharon	HBA1:c.142G>C

Strip B

	NOMENCLATURE HGVS *
anti 3.7	-
α2 init cd	HBA2:c.2T>C
α2 cd 19 -G	HBA2:c.56delG
α2 IVS1 -5nt	HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG
α2 cd 59 Hb Adana	HBA2:c.179G>A
α2 cd 125 Hb Quong Sze	HBA2:c.377T>C
α2 cd 142 Hb Constant Spring	HBA2:c.427T>C
α2 cd 142 Hb Icaria	HBA2:c.427T>A
α2 cd 142 Hb Pakse	HBA2:c.429A>T
α2 cd 142 Hb Koya Dora	HBA2:c.428A>C
α2 poly-A1	HBA2:c.*+94A>G
α2 poly-A2	HBA2:c.*+92A>G




* Human Genome Variation Society; sequenza di riferimento: NG_000006.1

COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

⇒ BOX A (conservazione a -25/-15°C)

Reagenti	Codice NLM	Quantità	N° Vial
PCR Mix A1 (tappo trasparente) Soluzione contenente oligonucleotidi	KA862-n	440 µl	1
PCR Mix A2 (tappo giallo) Soluzione contenente oligonucleotidi	KA883-n	440 µl	1
PCR Mix A3 (tappo viola) Soluzione contenente oligonucleotidi	KA939-n	440 µl	1
PCR Mix B (tappo blu) Soluzione contenente oligonucleotidi	KA891-n	440 µl	1
Enzyme mix-AC099 (tappo bianco) Soluzione contenente enzimi	KA1026-n	50 µl	1

⇒ BOX B (conservazione a +2/+8°C)

Reagenti		Codice NLM	Quantità	N° Vial	
Strisce A Strisce B Membrane di nitrocellulosa rivestita con oligonucleotidi		-	KC036-n KC027-n	10 10	1 1
DNAT Soluzione denaturante contenente NaOH	 PERICOLO	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107-n	0,8 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	-	-		2	
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:
 - Zona 1: manipolazione dei campioni ed estrazione; preparazione PCR in automatico
 - Zona 2: preparazione della Master Mix (in manuale)
 - Zona 3: post PCR
- 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 (per sistema manuale o per sistemi automatici)
- Estrattore/Preparatore di PCR e relativi consumabili
- 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

⇒ **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. In particolare:
 - T100 (BioRad) e SimpliAmp (Applied Biosystems): impostare 2,5°C/sec
 - Mastercycler ep gradient S: impostare le rampe al 40% (incremento di temperatura) e al 50% (diminuzione di temperatura)
- ✓ Per la valutazione della compatibilità tra termociclatore e sistema di estrazione del DNA, rivolgersi al fornitore.

PROCEDIMENTO

ISOLAMENTO DEL DNA

Estrazione manuale: cod. NLM AA1001.

È possibile utilizzare qualunque altro tipo di estrazione che sia equivalente in termini di concentrazione e purezza del DNA.

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

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 del sangue.

AMPLIFICAZIONE

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

Evitare ripetuti scongelamenti delle mix di amplificazione e dell'Enzyme mix.

Preparazione Master Mix in manuale

Per ciascuna delle quattro mix (Mix A1, A2, A3 e B) procedere come indicato:

Reagenti	Volume per campione
PCR Mix A1, A2, A3 e B	26,3 µl
Enzyme mix-AC099	0,7 µl

- Preparare la Master Mix per ciascuna Mix, per il numero di campioni estratti + 1 volume.
- Miscelare delicatamente e dispensare **27 µl** di Master Mix nelle provette da 0,2 ml precedentemente contrassegnate. Scartare la Master Mix avanzata.
- Aggiungere in ciascuna provetta **3 µl** del rispettivo DNA (**la concentrazione del DNA estratto da analizzare deve essere di circa 10-40 ng/µl**).

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
37°C	10 min	1
97°C	3 min	1
97°C	40 sec	15
66°C*	50 sec	
72°C	1min 30sec	
97°C	40 sec	25
56°C	50 sec	
72°C	1 min 30sec	
72°C	3 min	1
10°C	∞	

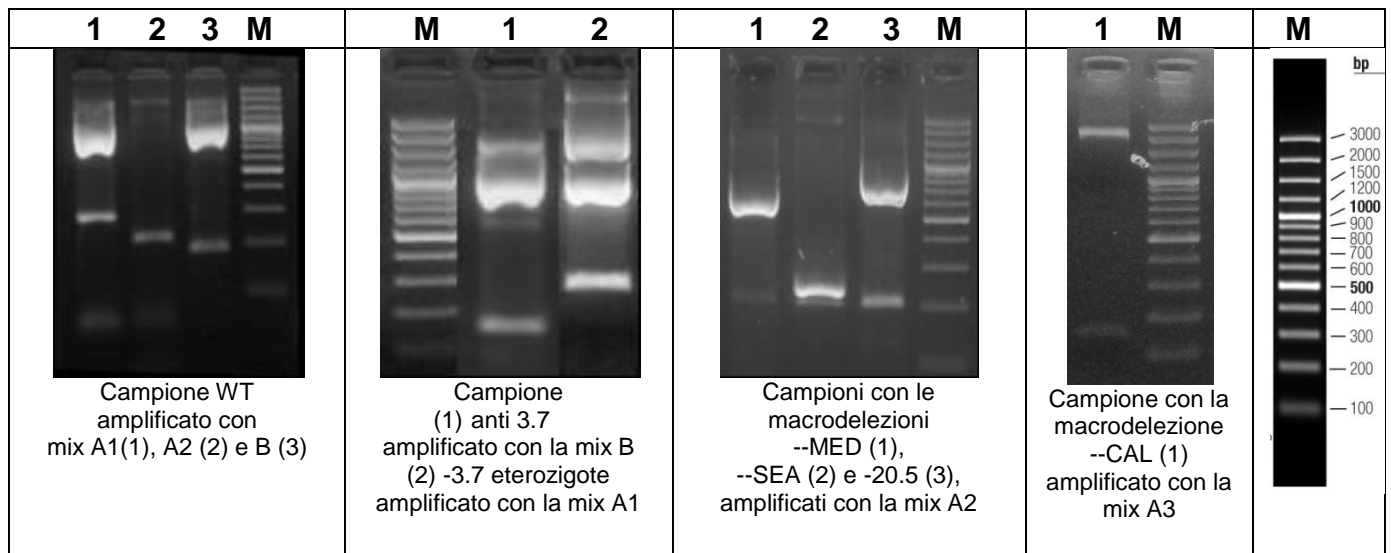
* per i termociclatori PTC 100 (MJ Research), GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems) con supporto, Mastercycler ep gradient S impostare una temperatura di annealing pari a 65°C.

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.

Mix	Amplificati	Lunghezza amplificato (bp)
A1	-3.7	1600
	Gene alfa 1	925
	Controllo PCR A1	273
A2	-4.2	1000
	-20.5	750
	--MED	650
	--SEA	250
	--FIL	700
	Controllo PCR A2	192
A3	--CAL	1800
	Controllo PCR A3	141
B	anti 3.7	1900
	Gene alfa 2	926
	Controllo PCR B	176

Esempi



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 **15 µl di amplificato di mix A1 + 15 µl di mix A2 + 15 µl di mix A3 e 45 µl di DNAT** per la strip **A** e **15 µl di amplificato di mix B + 15 µl di DNAT** per la strip **B** 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.
- Lasciare 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 **45 µl** di **DNAT** per le strip **A** e **15 µl** di **DNAT** per le strip **B**.
Attenzione: non utilizzare il DNAT se non si presenta di colore blu.
- Per ciascun campione aggiungere **15 µl** di amplificato di **mix A1** + **15 µl** di **mix A2** + **15 µl** di **mix A3** per le strip **A** e **15 µl** di amplificato di **mix B** per le strip **B** 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.

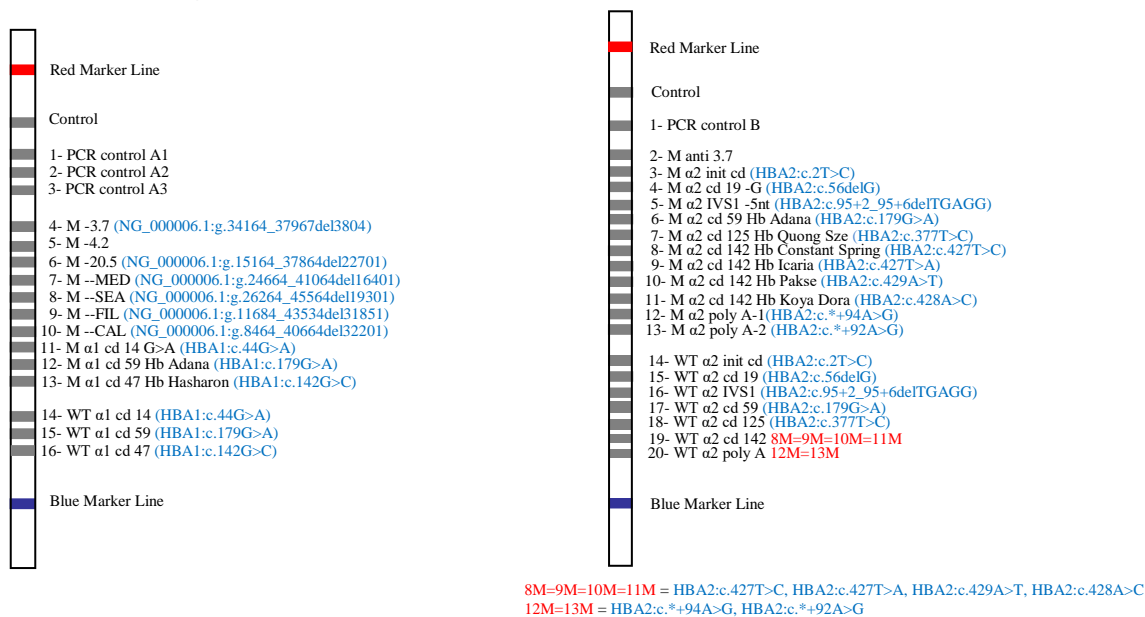
Sviluppo del colore (temperatura ambiente)

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 qui di seguito 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.

Una reazione positiva della banda di Controllo indica il corretto funzionamento del coniugato e dello sviluppatore del colore. Questa banda deve **sempre** essere positiva.



La banda del controllo di PCR deve sempre essere presente.

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

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

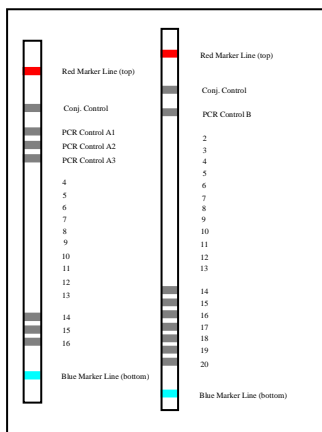
Attenzione

- L'intensità di colorazione delle diverse bande positive presenti sulla stessa striscia può essere diversa: questo non influisce sull'interpretazione dei risultati.
- Alcune mutazioni, poiché distanziate da pochi nucleotidi nel gene alfa-globina, hanno la sonda wild type comune.
In caso di campione eterozigote per due mutazioni con la sonda wt in comune (es: Hb Constant Spring + Hb Pakse), si osserva l'assenza di segnale sulla sonda wt corrispondente.
- Nel caso dell'eterozigote composto -3.7/Hasharon la sonda 16 può risultare debole o assente. Refertare comunque il campione come doppio eterozigote.
- Il test non permette di distinguere tra la condizione eterozigote e omozigote mutato dell'anti triplicato alfa (anti 3.7).
- In presenza di macrodelezioni le sonde wild type delle due strip si comportano in modo diverso a seconda della zigosità delle macrodelezioni stesse:

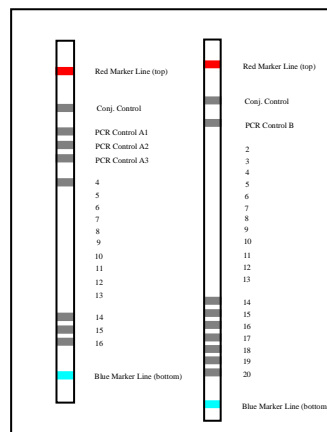
Delezione	Omozigote mutato*	Eterozigote
-3.7	I segnali WT strip B sono assenti	Tutti i segnali WT sono presenti
-4.2		
-20.5	I segnali WT 14 e 16 della strip A e tutti quelli della strip B sono assenti	
--MED	Tutti i segnali WT sono assenti	
--SEA		
--FIL		
--CAL		

* E' possibile ottenere lo stesso risultato anche in presenza di una delle macrodelezioni elencate associata ad una delezione del gene alfa1 o alfa1/alfa2 non indagata dal presente kit. Si raccomanda di confrontare sempre il risultato della striscia con gli altri parametri di laboratorio del medesimo campione.

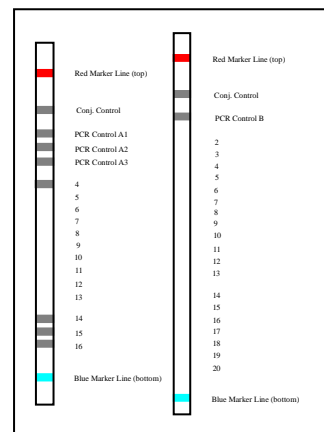
Esempi



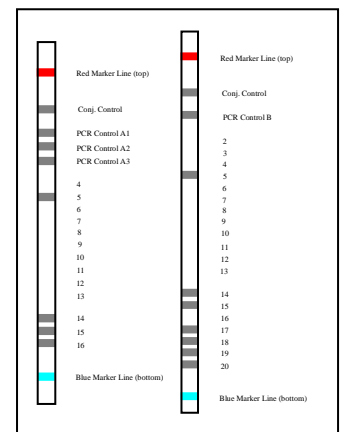
Normale



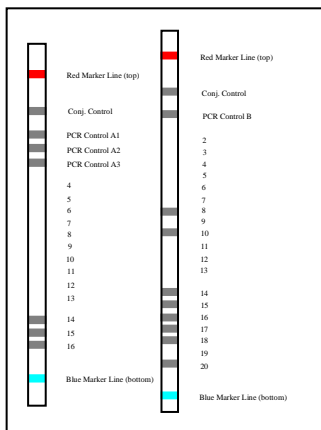
-3.7 in eterozigosi



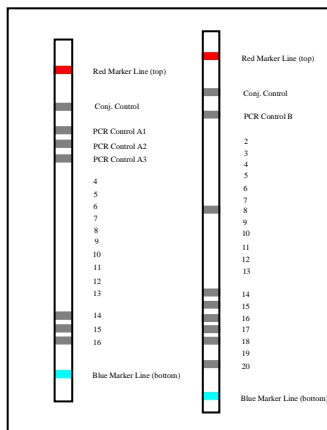
-3.7 in omozigosi



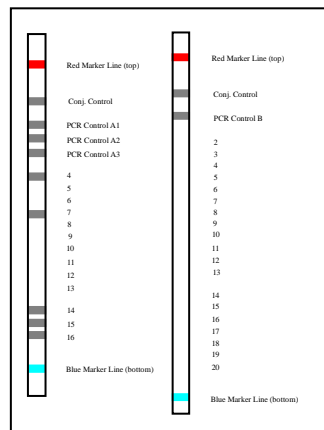
-4.2/IVS1-5nt



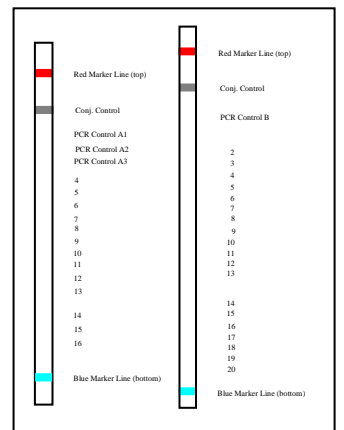
Hb Constant Spring/Pakse



Hb Constant Spring omozigote



-3.7/--MED



Ctr negativo/PCR fallita

POSSIBILI PROBLEMI

SEGNALI FALSI NEGATIVI O ECCESSIVAMENTE DEBOLI

- Amplificato non adeguato a causa di amplificazione inefficiente, dovuta ad esempio a:
 - mancato rispetto dei volumi nella fase di allestimento della PCR;
 - bassa concentrazione e/o purezza del DNA; verificare che il rapporto A260/A230 sia circa 2 ($1,8 \leq \text{valore} \leq 2,2$).
 - anomalie del termociclatore.
- Assenza e/o debolezza di segnale (tranne per la banda del controllo di rivelazione) possono essere causate da temperature maggiori rispetto all'intervallo indicato durante le fasi di ibridazione e di Lavaggio Stringente.

Controllare attentamente la temperatura del bagno termostato.

- Ibridazione e 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.

SEGNALI FALSI POSITIVI

- Si possono ottenere segnali aspecifici sulla striscia se la temperatura durante l'ibridazione ed il 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**

COLORAZIONE DISOMOGENEA DELLA SINGOLA BANDA

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

ATTENZIONE

In campioni che presentano la mutazione --CAL è possibile che, utilizzando termociclatori molto efficienti, si formi un fondo diffuso su tutta la striscia. Questo non influisce sull'interpretazione dei risultati.

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.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit "ALFA GLOBINA TEST", espressa come la quantità minima di marcatore bersaglio che può essere esattamente rilevata, è pari a 10 ng/μl di DNA.

Specificità diagnostica

La specificità del kit "ALFA GLOBINA TEST" è stata determinata analizzando 65 campioni. Non sono stati ottenuti falsi positivi. In accordo con tali dati, la specificità del kit è pari al 100%.

Riproducibilità

INTRASAGGIO

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

INTERSAGGIO

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

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

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit "ALFA GLOBINA TEST" è stata valutata analizzando 65 campioni di DNA positivi per le mutazioni indagate. Sono stati utilizzati 58 campioni di DNA ottenuti da sangue intero e 7 campioni sintetici.

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

Campioni utilizzati

N° campioni	Mutazione	Nomenclatura HGVS
5	-3,7	NG_000006.1:g.34164_37967del3804
4	-4,2	-
4	-20,5	NG_000006.1:g.15164_37864del22701
4	--MED	NG_000006.1:g.24664_41064del16401
5	--SEA	NG_000006.1:g.26264_45564del19301
3	--FIL	NG_000006.1:g.11684_43534del31851
4	--CAL	NG_000006.1:g.8464_40664del32201
2	α1 cd 14 G>A	HBA1:c.44G>A
1	α1 cd 59 Hb Adana	HBA1:c.179G>A
2	α1 cd 47 Hb Hasharon	HBA1:c.142G>C
5	anti 3.7	-
4	α2 init cd	HBA2:c.2T>C
1	α2 cd 19-G	HBA2:c.56delG
4	α2 IVS1-5nt	HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG
1	α2 cd 59 Hb Adana	HBA2:c.179G>A
1	α2 cd 125 Hb Quong Sze	HBA2:c.377T>C
4	α2 cd 142 Hb Constant Spring	HBA2:c.427T>C
3	α2 cd 142 Hb Icaria	HBA2:c.427T>A
1	α2 cd 142 Hb Pakse	HBA2:c.429A>T
1	α2 cd 142 Hb Koya Dora	HBA2:c.428A>C
4	α2 poly A-1	HBA2:c.*+94A>G
2	α2 poly A-2	HBA2:c.*+92A>G

LOT

Numero di lotto

REF

Codice



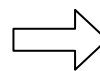
Limiti di
temperatura



Usare entro



Consultare le
istruzioni d'uso



Testo modificato
rispetto alla
precedente
versione



Conformità
Europea



Prodotto da

IVD

Dispositivo medico-
diagnostico *in vitro*



Contenuto
sufficiente
per <x> tests



Tenere al riparo
dalla luce solare

Instructions for Use

ver. 10 - 14/04/2022

Molecular Biology

ALPHA GLOBIN TEST

REF

AC099

CE



10 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 Alpha Globin Test device provides reagents for the identification of 22 alterations of alpha-globin gene, involved in alpha type thalassemia, through the amplification of the target sequences, reverse-hybridization and colour development.

In the device are included the **Enzyme mix-AC099** containing:

- the amplification enzyme
- Uracil-DNA Glycosylase (UNG) to prevent the contamination by amplification products.

This device has been validated with:

- a) manual column-based extraction (NLM code AA1001) and with the most common automatic systems for nucleic acids purification.
- b) PTC100 (MJ Research); GeneAmp® 9700, AB2720, Veriti e SimpliAmp (Applied Biosystems); Mastercycler ep gradient S (Eppendorf); T100 (BioRad) thermal cycler instruments.
- ⇒ c) automatic detection instruments: Tecan ProfiBlot 48 and Dynex Dynablot Heat

INTRODUCTION

Alpha-thalassemia is one of the most common haemoglobinopathies in the world and it is caused by the absence or reduced synthesis of alpha-globin chains. Originally, α -thalassemias were only endemic in malarial regions but recent global migration of people from these areas resulted in a world-wide occurrence of these diseases.

The presence on the short arm of chromosome 16 of two copies of alpha-globin genes per haploid genome makes the pathology of alpha-thalassemia far more complicated than that of beta-thalassemia.

There are four major types of alpha-thalassemia:

- α^+ thalassemia ($-\alpha/\alpha$) in which one of the two linked α -globin genes on a chromosome is inactivated
- α^0 thalassemia ($--/\alpha$) in which two α -globin genes are inactivated
- haemoglobin H disease ($--/\alpha$) in which three α -globin genes are absent with consequent chronic haemolytic anaemia of variable severity, splenomegaly and a shortened red cells survival
- Hb Bart's hydrops fetalis ($--/--$) is caused by the absence of alpha chain production and fetuses die either *in utero* or shortly after birth.

Although individuals with three functional α genes ($-\alpha/\alpha$) are clinically and haematologically silent and carriers with α -thalassemia trait ($-\alpha/\alpha$ or $--/\alpha$) only result in very mild hypochromic microcytic anaemia, couples with these genotypes are at risk of having a hydrop baby or with HbH disease.

For suitable clinical patients management, the achieved result using this kit should always be associated with patient clinical evaluations and other laboratory parameters.

REFERENCES

- Fortina, Dianzani, Serra, Gottardi, Saglio, Farinasso, Piga, Gabutti, Camaschella, *British Journal of Haematology* 1991; 78: 529-534
- Oron-Karni, Filon, Oppenheim and Rund, *American Journal of Hematology* 1998; 58: 306-310
- Liu, Old, Miles, Fisher, Weatherall and Clegg, *British Journal of Haematology* 2000; 108: 295-299
- Samuel S. Chong, Corinne D. Boehm, Douglas R. Higgs, and Garry R. Cutting, *Blood*, 1 Jan 2000 Vol 95
- Arnold S.-C. Tan, Thuan C. Quah, Poh S. Low and Samuel S. Chong, *Blood* 2001; 98: 250-251
- Neishabury, Abbasi-Moheb, Poorfathollah, *Arch Irrn Med* 2001; 4 (4):160-164
- Foglietta, Bianco, Maggio, and Giambona, *American Journal of Hematology* 2003; 74:191–195
- David H. K. Chui, Suthat Fucharoen and Vivian Chan, *Blood* 2003; 101: 791-800

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 colour developer.

The analysis consists of three steps:

1. DNA extraction from non-coagulated blood (see the procedure in the following *Extraction* paragraph);
2. 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:

Strip A

	HGVS NOMENCLATURE*
-3.7 (type I)	NG_000006.1:g.34164_37967del3804
-4.2	-
-20.5	NG_000006.1:g.15164_37864del22701
--MED	NG_000006.1:g.24664_41064del16401
--SEA	NG_000006.1:g.26264_45564del19301
--FIL	NG_000006.1:g.11684_43534del31851
--CAL	NG_000006.1:g.8464_40664del32201
α1 cd 14 G>A	HBA1:c.44G>A
α1 cd 59 Hb Adana	HBA1:c.179G>A
α1 cd 47 Hasharon	HBA2:c.142G>C

Strip B

	HGVS NOMENCLATURE*
anti 3.7	-
α2 init cd	HBA2:c.2T>C
α2 cd 19 -G	HBA2:c.56delG
α2 IVS1 -5nt	HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG
α2 cd 59 Hb Adana	HBA2:c.179G>A
α2 cd 125 Hb Quong Sze	HBA2:c.377T>C
α2 cd 142 Hb Constant Spring	HBA2:c.427T>C
α2 cd 142 Hb Icaria	HBA2:c.427T>A
α2 cd 142 Hb Pakse	HBA2:c.429A>T
α2 cd 142 Hb Koya Dora	HBA2:c.428A>C
α2 poly-A1	HBA2:c.*+94A>G
α2 poly-A2	HBA2:c.*+92A>G




*Human Genome Variation Society; reference sequence: NG_000006.1

PRODUCT COMPOSITION

⇒ BOX A (store at -25/-15°C)

Reagents	NLM Code	Quantity	N° Vial
PCR Mix A1 (transparent cap) Solution containing oligonucleotides	KA862-n	440 µl	1
PCR Mix A2 (yellow cap) Solution containing oligonucleotides	KA883-n	440 µl	1
PCR Mix A3 (violet cap) Solution containing oligonucleotides	KA939-n	440 µl	1
PCR Mix B (blue cap) Solution containing oligonucleotides	KA891-n	440 µl	1
Enzyme Mix-AC099 (white cap) Solution containing enzymes	KA1026-n	50 µl	1

⇒ BOX B (store at +2/+8°C)

Reagents		NLM Code	Quantity	N° Vial	
Strips A Strips B Nitrocellulose membranes coated with oligonucleotides		-	KC036-n KC027-n	10 10	1 1
DNAT Denaturation solution containing NaOH	 DANGER	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107-n	0,8 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	-	-		2	
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: samples handling and extraction; PCR set-up with automatic systems
 - Area 2: Master Mix preparation (manual).
 - 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
- Automatic system for DNA purification and PCR set-up and disposables
- Vertical downflow air box
- Dedicated adjustable volume pipettes set
- Aerosol-resistant pipettes tips and disposable 1,5 ml tubes

AREA 2

- Vertical downflow air box
- Dedicated adjustable volume pipettes set
- Aerosol-resistant pipettes tips
- 0,2 ml PCR tubes

⇒ **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 ($45 \pm 0,5$ °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 $\leq 3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. Specifically:
 - for T100 (BioRad) and SimplyAmp (Applied Biosystems) the ramp rate is $2,5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$;
 - for Mastercycler ep gradient set as 40% (heating ramp rate) and 50% (cooling ramp rate)
- ✓ Contact NLM for informations about compatibility between thermal cycler and DNA extraction

PROCEDURE

DNA EXTRACTION

Manual purification: NLM code AA1001.

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.

Use EDTA or citrate only as anticoagulant, do not use heparin. It is possible to use fresh blood, blood stored at $+2/+8^{\circ}\text{C}$ for no more than 2 days or stored at $-25/-15^{\circ}\text{C}$ for longer storage periods.

The use of frozen blood is recommended since freezing and thawing enhance blood cells lysis.

AMPLIFICATION

Keep all the reagents for the amplification on ice during the execution of the whole procedure. Avoid repeated freeze-thaw cycles of the amplification and Enzyme mix.

Master Mix preparation (manual)

For each of the four mixes (Mix A1, Mix A2, Mix A3, Mix B) proceed as follows:

Reagents	Volume/sample
PCR Mix A1, A2, A3 and B	26,3 µl
Enzyme mix-AC099	0,7 µl

- Prepare the Master Mix for the number of samples extracted + 1 more volume.
- Mix gently and dispense **27 µl** of Master Mix in the previously marked 0,2 ml test tubes. Discard the remaining Master Mix.
- Add **3 µl** of DNA to each tube and mix pipetting up and down (**DNA concentration to be used should be 10-40 ng/µl**).

Amplification program

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

Temperature	Time	Cycles
37°C	10 min	1
97°C	3 min	1
97°C	40 sec	15
66°C*	50 sec	
72°C	1min 30sec	
97°C	40 sec	25
56°C	50 sec	
72°C	1 min 30sec	
72°C	3 min	1
10°C	∞	

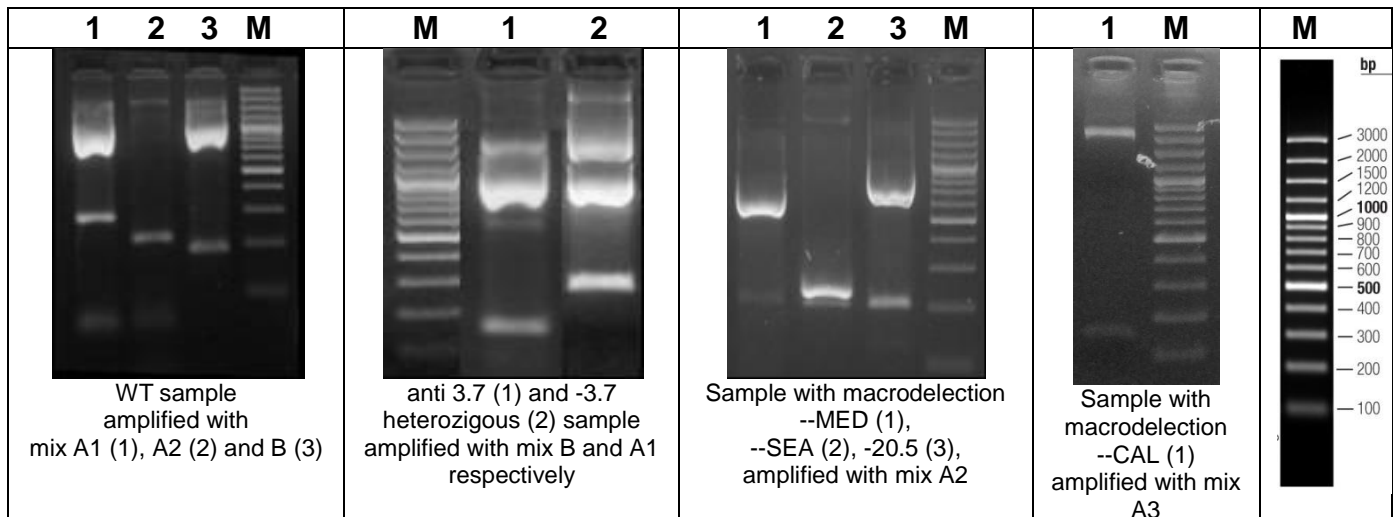
* for PTC 100 MJ Research, GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems) with sample tray only, Mastercycler ep gradient S set up the annealing temperature to 65°C.

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 a DNA intercalating agent.

Mix	Amplicon	Amplicon length (bp)
A1	-3.7	1600
	Alfa 1 Gene	925
	A1 PCR Control	273
A2	-4.2	1000
	-20.5	750
	--MED	650
	--SEA	250
	--FIL	700
	A2 PCR Control	192
A3	--CAL	1800
	A3 PCR Control	141
B	anti 3.7	1900
	Alfa 2 Gene	926
	B PCR Control	176

Examples



AUTOMATIC DETECTION



Detection can be performed by using automatic instrument (ProfiBlot T48, Dynablot or similar instrument): select the **“COAGUL 5”** program. In this case **15 µl A1 PCR product + 15 µl A2 PCR product + 15 µl A3 PCR product + 45 µl DNAT** and **15 µl B PCR product + 15 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 Typing 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 Colour 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 **45 µl of DNAT** for strip **A** and **15 µl of DNAT** for strip **B** into each lane of the Typing Tray
- Warning:** do not use DNAT if is not blue.
- For each sample add **15 µl of amplification product A1 + 15 µl of amplification product A2 + 15 µl of amplification product A3** for **strip A** and **15 µl of amplification product B** for **strip B** 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 colour 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 to 45°C) to each lane and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed to 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 to 45°C).
- Incubate **10 min** at **45 °C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
- Remove the solution from each lane.

Colour development (room temperature)

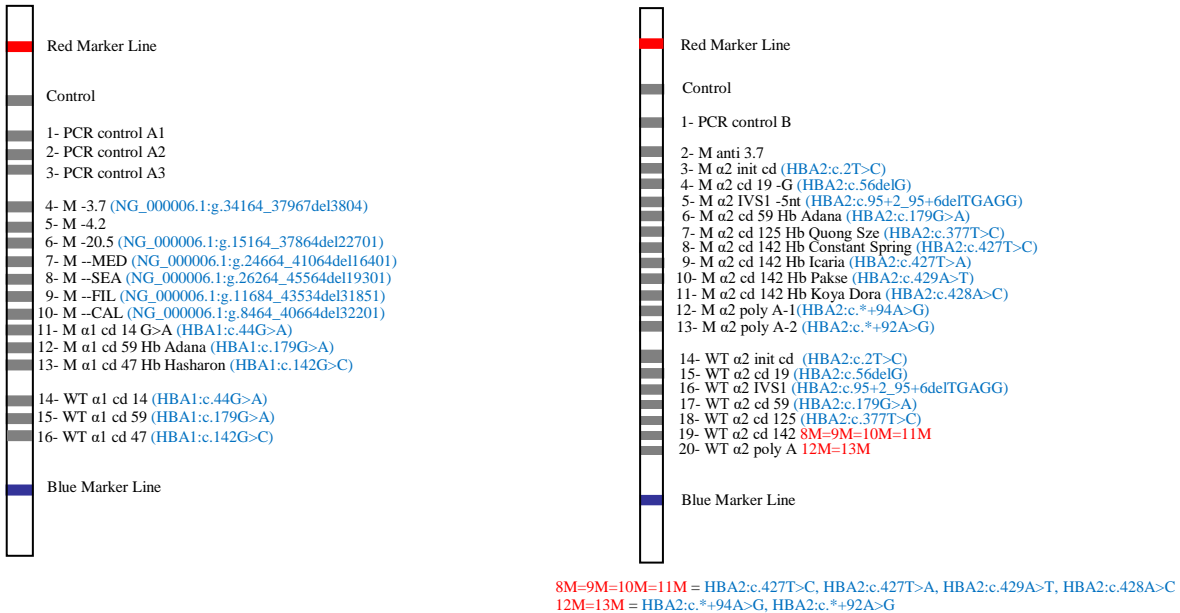
All the next steps have to be performed at room temperature with shaking. Since water takes too much time to reach room temperature, place a tray (for example of polystyrene) on the lid of the water bath to isolate the Typing Trays from the hot water and use the agitation function of the water bath only.

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 **Colour developer**.
- Incubate for **20 min** in the dark, while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove colour 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 below 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, coloured marker lines on the top and on the bottom have to be used.

The detection control line (the upper one) indicates the correct reaction of both conjugate and colour developer: it **always** has to stain positive.

→ **The PCR control line always has to stain positive.**

- For each point mutation one of the following patterns should be obtained:
- Only wild type line Normal genotype (**homozygous wild type**)
- Wild type and mutant lines **Heterozygous** genotype
- Only mutant line **Homozygous mutant** genotype

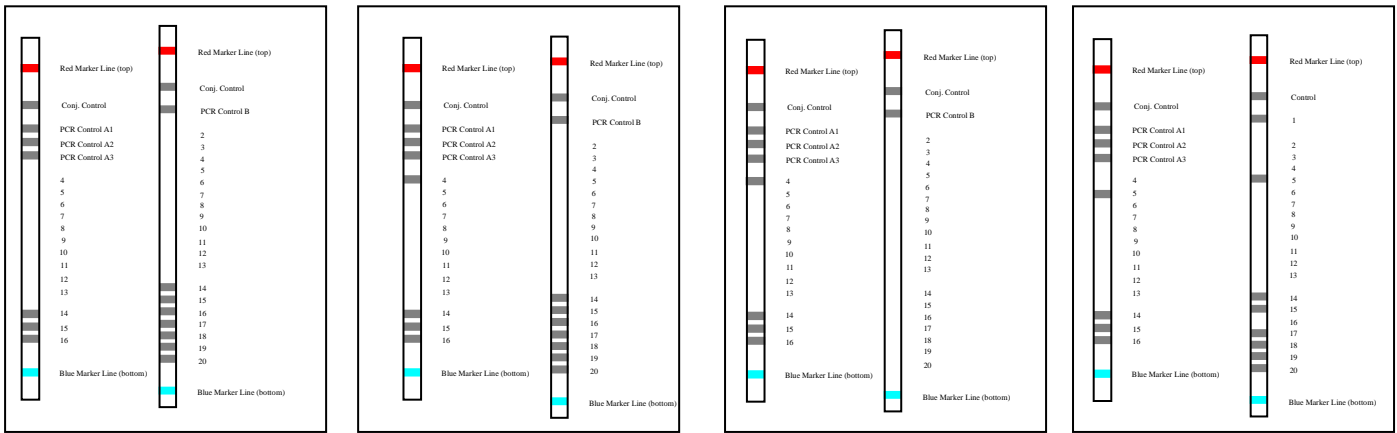
Warning:

- the colour intensity could be different between different bands on the same strip but this doesn't affect the interpretation of the results.
- Since some of the point mutations are located within a few nucleotides on the α -globin gene, they have a common wild type probe. Samples that are compound heterozygous for two of these mutations (e.g. Hb Constant Spring + Hb Pakse) don't show a positive signal on the common wild type probe.
- In composed -3.7/Hasharon case the 16 probe may be weak or absent. However, reference the sample as a double heterozygous.
- This kit does not allow to distinguish between the heterozygous and the homozygous mutant state of the anti 3.7 gene triplication.
- In macro deletions presence, the wild type probes of the two strips behave differently depending on the macro deletions zigosity status:

Deletion	Homozygous mutant*	Heterozygous
-3.7	WT signals on strip B absent	All WT signals present
-4.2		
-20.5	WT signals 14 and 16 on strip A and all WT on strip B absent	
--MED	All WT signals absent	
--SEA		
--FIL		
--CAL		

* Its possible achieve same result in presence of following macro deletion associated with alpha1 or alpha1/alpha2 deletions not detected by this kit. It is recommended to always compare the strip result with the other laboratory parameters for the same sample.

Examples

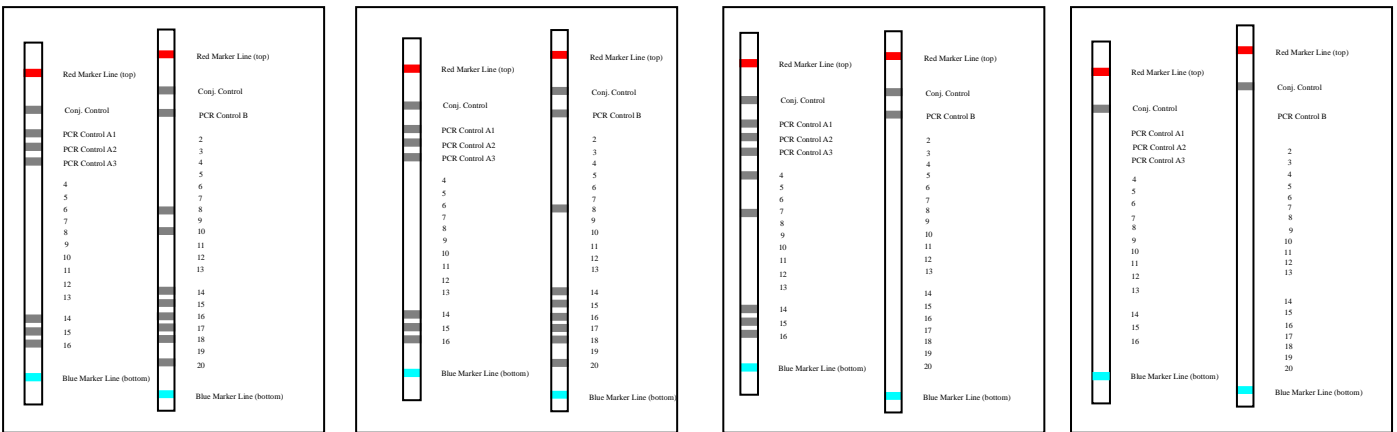


Normal

-3.7 heterozygous

-3.7 homozygous

-4.2/IVS1-5nt



Hb Constant Spring/Pakse

Hb Constant Spring homozygous

-3.7/--MED

Negative Ctr/PCR failure

TROUBLESHOOTING

FALSE NEGATIVE OR LOW SIGNALS

- Insufficient amplification product due to inefficient PCR, related to:
 - wrong reagent volumes in PCR setup.
 - low concentration and/or purity DNA; verify that the A260/A230 ratio is about 2 ($1.8 \leq \text{value} \leq 2.2$).
 - thermal cycler failure.
- Absence and/or weak signal (except Control Line) could be caused by temperature higher than indicated range for hybridization and Stringent Wash 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.

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 solution 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 Typing 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**

SINGLE LINE UNHOMOGENEOUS COLORATION

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

WARNING

--CAL samples amplified with efficient thermal cyclers could show a diffuse background on the strip. This doesn't affect the interpretation of the results.

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.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the kit "ALPHA GLOBIN TEST", expressed as the minimum quantity of the target that can be detected, is equal to 10 ng/μl DNA.

Diagnostic specificity

The specificity was determined by analyzing 65 samples. No false positive results were obtained.

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

Reproducibility

INTRA-ASSAY:

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

INTER-ASSAY:

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

Tests were performed as described in the method and the reproducibility was 100%.

Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity of the kit "ALPHA GLOBIN TEST" was assessed by analyzing 65 DNA sample positive for the mutations investigated by the kit. We used 58 samples of DNA obtained from whole blood and 7 synthetic sample.

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

Samples used

Nr samples	Mutation	HGVS nomenclature
5	-3,7	NG_000006.1:g.34164_37967del3804
4	-4,2	-
4	-20,5	NG_000006.1:g.15164_37864del22701
4	--MED	NG_000006.1:g.24664_41064del16401
5	--SEA	NG_000006.1:g.26264_45564del19301
3	--FIL	NG_000006.1:g.11684_43534del31851
4	--CAL	NG_000006.1:g.8464_40664del32201
2	α1 cd 14 G>A	HBA1:c.44G>A
1	α1 cd 59 Hb Adana	HBA1:c.179G>A
2	α1 cd 47 Hb Hasharon	HBA2:c.142G>C
5	anti 3.7	-
4	α2 init cd	HBA2:c.2T>C
1	α2 cd 19-G	HBA2:c.56delG
4	α2 IVS1-5nt	HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG
1	α2 cd 59 Hb Adana	HBA2:c.179G>A
1	α2 cd 125 Hb Quong Sze	HBA2:c.377T>C
4	α2 cd 142 Hb Constant Spring	HBA2:c.427T>C
3	α2 cd 142 Hb Icaria	HBA2:c.427T>A
1	α2 cd 142 Hb Pakse	HBA2:c.429A>T
1	α2 cd 142 Hb Koya Dora	HBA2:c.428A>C
4	α2 poly A-1	HBA2:c.*+94A>G
2	α2 poly A-2	HBA2:c.*+92A>G

