

Istruzioni d'uso

ver. 6 - 21/04/2022

Biologia Molecolare

BETA GLOBINA PLUS TEST

REF

AC104

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 **AC104** fornisce il materiale necessario per l'identificazione del triplicato del gene alfa-globina (anti 3.7) e di 14 mutazioni/delezioni del gene beta-globina (**HBB**) 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 emoglobinopatie costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie monogeniche diffuse in tutto il mondo.

Sono comunemente suddivise in tre sottogruppi parzialmente sovrapposti: le varianti strutturali (caratterizzate dalla produzione di catene globiniche anomale), le talassemie (caratterizzate da una sintesi alterata di una o più catene globiniche) e le condizioni di persistenza della emoglobina fetale nell'adulto (HPFH) (Weatherall & Clegg, 2001; Galanello & Origa, 2010).

Le varianti strutturali comprendono, ad esempio, l'HbE (diffusa in India e in Asia) e Hb Lepore (causata da un evento di crossing-over errato tra i geni δ - e β -globina che determina la formazione di una catena globinica ibrida).

Le talassemie di tipo beta sono causate da alterazioni del gene β -globina (HBB) localizzato sul cromosoma 11 (in genere sostituzioni, delezioni o inserzioni di pochi nucleotidi) che determinano una sintesi ridotta (beta+) o assente (beta 0) delle catene beta del tetramero dell'emoglobina.

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

La presenza del triplicato del gene α -globina è un importante modulatore della severità nel caso si individuino portatori di una sola mutazione del gene beta-globina: la produzione eccessiva di catene α -globina conseguente determina infatti una maggiore severità clinica a causa del maggiore sbilanciamento delle catene globiniche (Cao & Moi, 2002; Weatherall, 2001).

Le sindromi HPFH sono caratterizzate da un'elevata attività dei geni γ , diminuita attività del gene β -globinico e livelli di HbA2 normali, cosicché la sintesi globinica risulta bilanciata (Wood, 2001).

Possono essere causati da grandi delezioni all'interno del cluster β -globina o mutazioni puntiformi nelle regioni del promotore prossimale o distante dei geni globinici fetali (Cao & Moi, 2000). Un esempio di delezione responsabile di HPFH è la delezione $\delta\beta^0$ -siciliana (Esposito G. et al., 1994). Un effetto simile sull' HbF, anche se meno evidente, è stato trovato anche nell' Hb Lepore (Weatherall & Clegg, 2001; Thein, 2005).

Tradizionalmente la diagnosi dei riarrangiamenti del gene veniva effettuata tramite Southern Blot e l'utilizzo di alcuni enzimi di restrizione, con un impiego notevole di tempo e di costi. I saggi che si basano sulla PCR, invece sono più rapidi, meno costosi e più sensibili.

BIBLIOGRAFIA

- Cao A. & Moi P. (2002). Regulation of the globin genes. *Pediatric Research*, 51, 4, pp. 415-421
- Esposito G., Grosso M., Gottardi E., Izzo P., Camaschella C. & Salvatore F. (1994). A unique origin for the Sicilian ($\delta\beta$)⁰-thalassemia in 33 unrelated families and its rapid diagnostic characterization by PCR analysis. *Human Genetics*, 93, pp. 691-693.
- Galanello R. & Origa R. (2010). β -thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*.
- Thein S.L., Menzel S., Lathrop M. & Garner C. (2009). Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Human Molecular Genetics*, 18, pp. 216-223
- Weatherall D.J. (2001). Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Reviews*, 2, pp. 245-255
- Weatherall D.J. & Clegg J.B. (2001). The Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, 2001,79(8)
- Wood, W.G. (2001) Hereditary persistence and fetal hemoglobin and $\delta\beta$ thalassemia. In *Disorders of Hemoglobin* (Steinberg, M.H., Forget, B.G., Higgs, D.R., and Nagel, R.L., eds.). pp. 356-388. Cambridge University Press, Cambridge.

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.	anti 3.7	-	
2.	-86 C>A	HBB:c.-136C>A	β^+
3.	-29 A>G	HBB:c.-79A>G	β^+
4.	cap+1 A>C	HBB:c.-50A>C	β^+
5.	cap+33 C>G	HBB:c.-18C>G	β^+
6.	cod 7 A>G HbG-San José	HBB:c.23A>G	variante
7.	cod 19 C>A HbD-Ouled Rabah	HBB:c.60C>A	variante
8.	cod 26 G>A HbE	HBB:c.79G>A	variante
9.	cod 47 G>A HbG-Copenaghen	HBB:c.142G>A	variante
10.	cod 104 G>C Hb Camperdown	HBB:c.315G>C	variante
11.	cod 121 G>C HbD-Punjab	HBB:c.364G>C	variante
12.	cod 121 G>A Hb O-Arab	HBB:c.364G>A	variante
13.	cod 126 T>G Hb Neapolis	HBB:c.380T>G	variante
14.	Hb Lepore-BW	NG_000007.3:g.63632_71046del	β^+
15.	Siciliana ($\delta\beta$) ⁰ delezione	NG_000007.3:g.64336_77738del13403	β^0

COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

⇒ BOX A (conservazione a -25/-15° C)

Reagenti	Codice NLM	Quantità	N° Vial
PCR Mix Soluzione contenente oligonucleotidi	KA888-n	800 µl	1

⇒ BOX B (conservazione a +2/+8° C)

Reagenti		Codice NLM	Quantità	N° Vial	
Strisce Membrana di nitrocellulosa rivestita con oligonucleotidi		-	KC034-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. Per il termociclatore T100 (BioRad) impostare la rampa 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	26,6 µl
DNA polimerasi (5U/µl), tappo arancione	0,4 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 **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**).

Nota: Il DNA estratto con Maxwell (Promega) e Magcore (RBCBioscience) deve essere diluito 1:3 prima dell'uso.

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

* per i termociclatori PTC 100 MJ Research, AB9700 (con supporto) e EP Gradient S impostare una temperatura di annealing pari a 65° C.

E' possibile amplificare i campioni anche utilizzando il profilo termico in uso nel kit ALFA GLOBINA TEST (cod. NLM AC099).

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

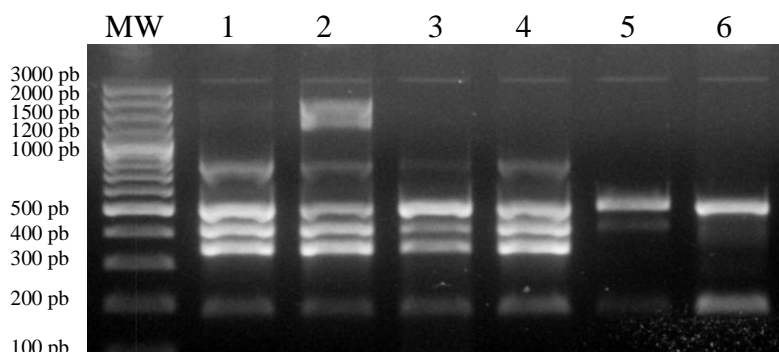
Opzionale: analizzare i prodotti di amplificazione su gel di agarosio al 2% un intercalante del DNA.

Mutazione	Lunghezza amplificato (bp)
Controllo PCR	182
-86 C>A, -29 A>G, cap+1 A>C, cap+33 C>G, HbG-San José, HbD-Ouled Rabah, HbE,	343
HbG-Copenaghen, Hb Camperdown, Hb Lepore-BW	413
HbD-Punjab, Hb O-Arab, Hb Neapolis	506
amplificati 343pb + 413pb	770
Anti 3.7	1700
Siciliana ($\delta\beta$) ⁰	499

Esempio:

Gel agarosio 2%

- 1) Wt
- 2) anti 3.7
- 3) Hb Lepore-BW eterozigote
- 4) Siciliana($\delta\beta$)⁰ eterozigote
- 5) Hb Lepore-BW eterozigote
- 6) Siciliana($\delta\beta$)⁰ eterozigote



Attenzione:

E' 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.

La banda di amplificazione di 1700 pb non corrisponde necessariamente all' anti 3.7.

La banda di amplificazione di 182 pb potrebbe non essere visibile su gel

RIVELAZIONE IN AUTOMATICO



La rivelazione può essere eseguita in automatico (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 ($45^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$) 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 seguente illustra la posizione delle diverse sonde sulla striscia.

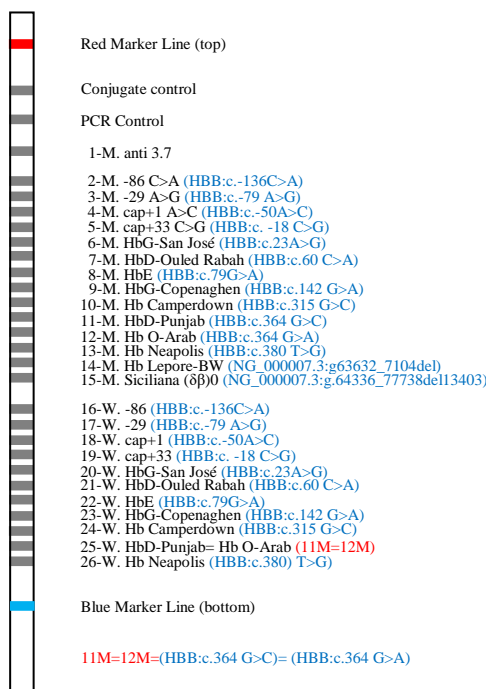
Una banda viene considerata positiva quando si colora di viola alla fine della procedura.

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:



Per ogni mutazione puntiforme 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:

- Le mutazioni HbD-Punjab e HbO-Arab, poiché a carico dello stesso codone, hanno la sonda wt in comune (25-W. cod.121).

In caso di campione doppio eterozigote per queste due mutazioni, si osserva quindi l'assenza di segnale sulla wt corrispondente.

- Nel caso di macrodelezioni (Hb Lepore-BW e delezione siciliana $\delta\beta$ -0), le sonde wt si comportano in modo diverso a seconda dell'omozigosità o eterozigosità:

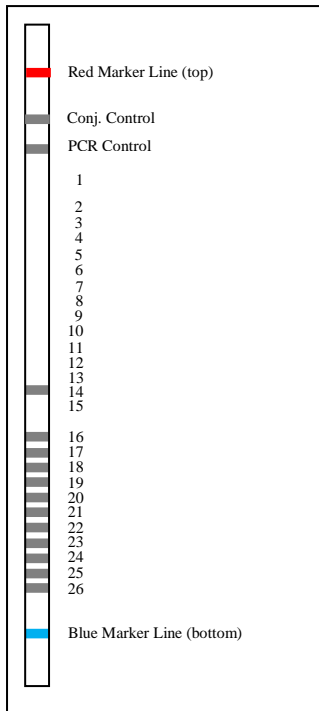
Delezione	Eterozigote	Omozigote
Hb Lepore-BW	Tutti i segnali wt sono presenti	I segnali wt dalla 16 alla 23 sono assenti
Siciliana ($\delta\beta$) ⁰	Tutti i segnali wt sono presenti	Tutti i segnali wt sono assenti

- Il test non permette di distinguere tra la condizione eterozigote e omozigote mutante dell'anti triplicato alfa (anti 3.7).
- Alcune mutazioni di questo kit, poiché distanziate da pochi nucleotidi nel gene beta-globina, hanno la sonda wt in comune a mutazioni del kit Beta Globina test (AC091).

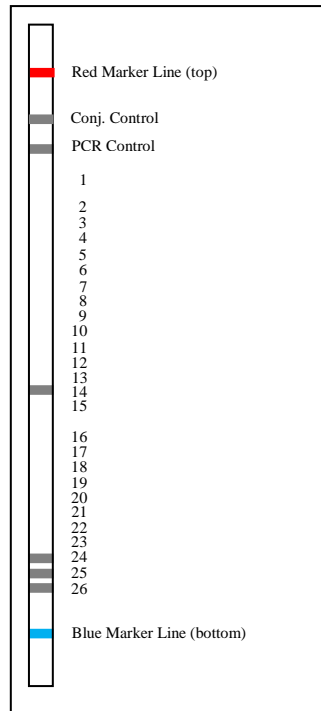
Beta globina test (AC091)	Beta globina plus test (AC104)
-92 C>T, -87C>G	-86 C>A
-30 T>A	-29 A>G
codone 5-CT, codone 6 HbC, codone 6 HbS, codone 6-A, codone 8-AA, codone 8/9 +G	San José
IVS2.1 G>A	Hb Camperdown

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 test, poiché il campione potrebbe essere un doppio eterozigote.

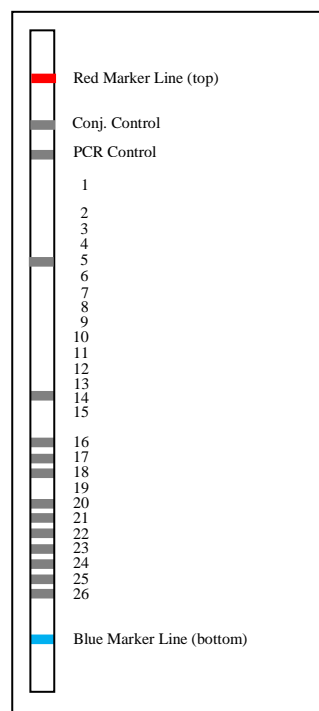
Esempi



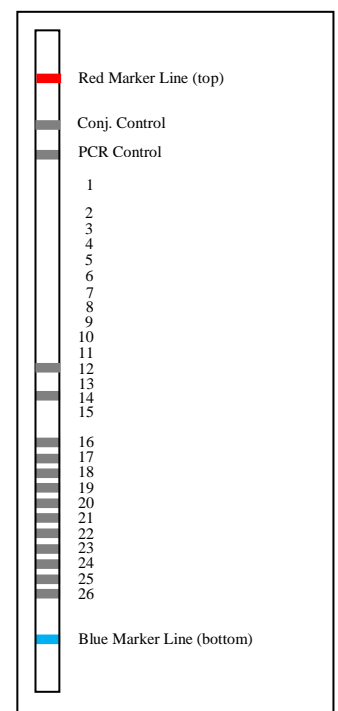
Hb Lepore eterozigosi



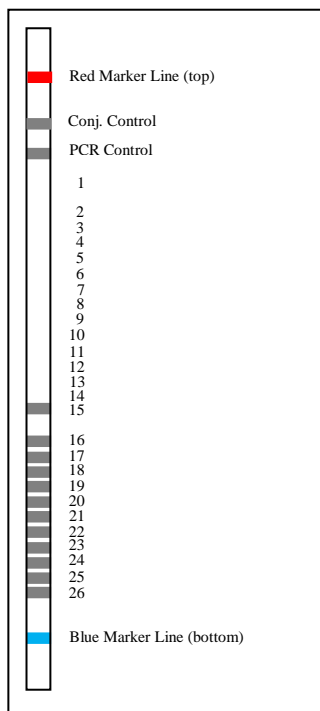
Hb Lepore in omozigosi



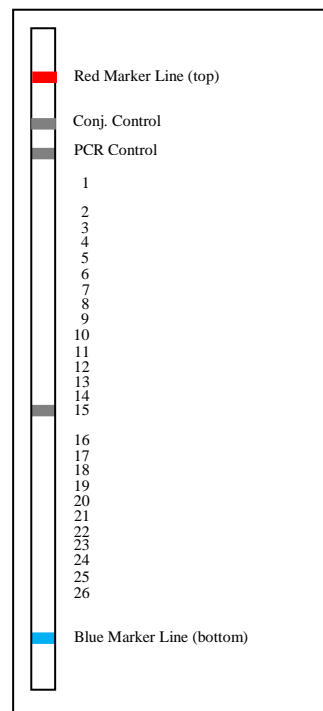
HbLepore/cap +33C>G



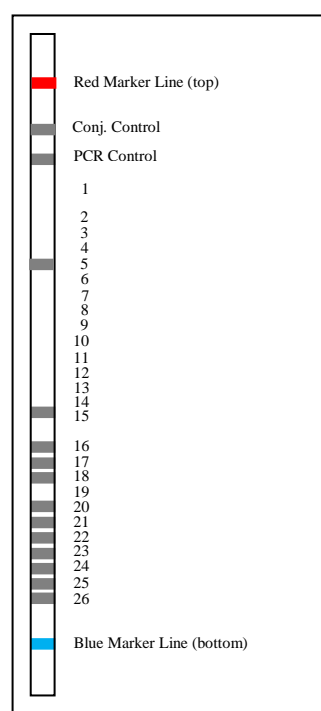
HbLepore/Hb O-Arab



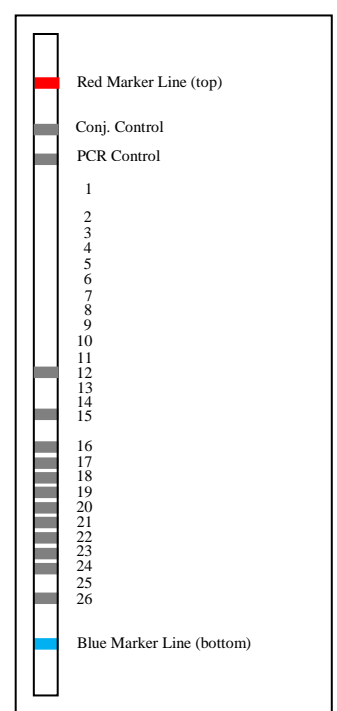
Siciliana ($\delta\beta$)0 in eterozigosi



Siciliana ($\delta\beta$)0 in omozigosi



Siciliana ($\delta\beta$)0 /cap +33C>G



Siciliana ($\delta\beta$)0 /Hb O-Arab

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 due 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 una banda wt può essere determinata dalla presenza (in omozigosi o doppia eterozigosi) di mutazioni non indagate dal kit ma localizzate sul gene Beta-globina in prossimità delle mutazioni analizzate. Variazioni della sequenza nucleotidica impediscono infatti all'amplificato di ibridarsi alla sonda wt.
- L'assenza di segnale sulla banda del controllo di PCR può indicare che il campione non si è amplificato (assenza di segnale su tutte le bande del gene HBB) oppure un abbinamento scorretto mix/striscia: è stato rivelato un amplificato ottenuto con kit BETA GLOBINA TEST (cod. NLM AC091) sulle strisce del kit BETA GLOBINA TEST PLUS (cod. NLM AC104). 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 caso di campione omozigote per la delezione Siciliana ($\delta\beta$)⁰, potrebbe comparire un debole segnale aspecifico sulle bande wt.

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 PLUS" è stata valutata analizzando 66 campioni di DNA positivi per le mutazioni indagate dal kit. Sono stati utilizzati 59 campioni di DNA ottenuti da sangue intero o villi coriali 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
8	anti 3.7	-
2	-86 C>A	HBB:c.-136C>A
4	-29 A>G	HBB:c.-79A>G
3	cap+1 A>C	HBB:c.-50A>C
3	cap+33 C>G	HBB:c.-18C>G
3	cod 7 A>G HbG-San José	HBB:c.23A>G
4	cod 19 C>A HbD-Ouled Rabah	HBB:c.60C>A
5	cod 26 G>A HbE	HBB:c.79G>A
7	cod 47 G>A HbG-Copenaghen	HBB:c.142G>A
3	cod 104 G>C Hb Camperdown	HBB:c.315G>C
6	cod 121 G>C HbD-Punjab	HBB:c.364G>C
3	cod 121 G>A Hb O-Arab	HBB:c.364G>A
4	cod 126 T>G Hb Neapolis	HBB:c.380T>G
6	Hb Lepore-BW	NG_000007.3:g.63632_71046del
5	Siciliana ($\delta\beta$) ⁰ delezione	NG_000007.3:g.64336_77738del13403

Sensibilità analitica

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

Specificità diagnostica

La specificità del kit "BETA GLOBINA TEST PLUS" è stata determinata analizzando 68 campioni. Non sono stati ottenuti risultati 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 2 replicati.

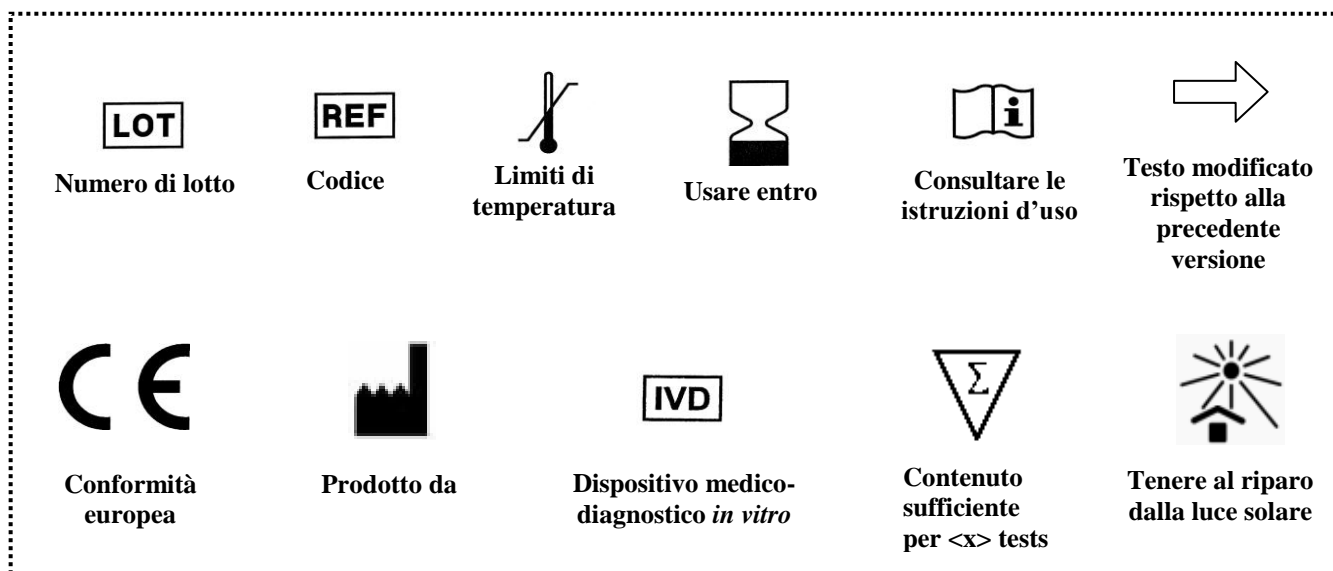
INTERSAGGIO

La riproducibilità intersaggio è stata testata facendo analizzare 4 campioni a tre diversi operatori. Per le prove sono stati utilizzati 4 lotti del kit e l'amplificazione è stata effettuata utilizzando diversi modelli di termociclatori.

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. 6 - 21/04/2022

Molecular Biology

BETA GLOBIN PLUS TEST

	AC104	
	20 TEST	
GMDN	59804	



 **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 **AC104** device provides reagents for the identification of the α -Globin Gene Triplications (anti 3.7) and 14 mutations/deletions of beta-globin gene (**HBB**), 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

The hemoglobinopathies are a heterogeneous group of monogenic diseases spread worldwide.

They are commonly divided into three subgroups partially overlapped: the structural variants (characterized by the production of abnormal globin chains), thalassemias (due to an impaired synthesis of one or more globin chains) and the conditions of hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH) in adult life (Weatherall & Clegg, 2001; Galanello & Origa, 2010).

The subgroup of structural variants include, for example, the HbE (widespread in India and in Asia) and Hb Lepore (due to unequal crossing-over events which involves the δ - and β -globin gene and determines the formation of a hybrid globin chain).

The β -thalassemias are due to alterations in β -globin gene (HBB) located on chromosome 11 (single base changes, small deletions or insertions) that determine a reduced (beta +) or absent (beta 0) synthesis of the beta chains of the hemoglobin tetramer.

Concerning the clinical and haematological features, β -thalassemias are classified according to severity: thalassemia minor (carrier of beta thalassemia), thalassemia intermedia and thalassemia major.

The presence of α -globin gene triplication is an important modulator of severity in individuals carrying a single mutation in the β -globin gene: the excessive production of α -globin chains results in a greater clinical severity due to the increased imbalance globin chain production (Cao & Moi, 2002; Weatherall, 2001)

HPFH syndroms are characterized by a high activity of γ -genes and decreased activity of the β -globin gene, so that the normal levels of HbA2 globin synthesis are balanced (Wood, 2001).

Forms of HPFH may be caused by large deletions within the β -globin cluster or point mutations in the proximal or distant promoter regions of the fetal globin genes (Cao & Moi, 2000). An example of HPFH deletions in the β -globin cluster is the Sicilian $\delta\beta^0$ deletion (Esposito G. et al., 1994). A similar but less marked effect on HbF increase is found in the Hb Lepore (Weatherall & Clegg, 2001)

Traditionally, the diagnosis of the rearrangements of the gene was performed by Southern blot and the use of certain restriction enzymes, with a considerable use of time and costs. The assays that are based on the PCR, however are more rapid, less expensive and more sensitive.

REFERENCES

- Cao A. & Moi P. (2002). Regulation of the globin genes. *Pediatric Research*, 51, 4, pp. 415-421
- Esposito G., Grosso M., Gottardi E., Izzo P., Camaschella C. & Salvatore F. (1994). A unique origin for the Sicilian ($\delta\beta$)⁰-thalassemia in 33 unrelated families and its rapid diagnostic characterization by PCR analysis. *Human Genetics*, 93, pp. 691-693.
- Galanello R. & Origa R. (2010). β -thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*.
- Thein S.L., Menzel S., Lathrop M. & Garner C. (2009). Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Human Molecular Genetics*, 18, pp. 216-223
- Weatherall D.J. (2001). Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Reviews*, 2, pp. 245-255
- Weatherall D.J. & Clegg J.B. (2001). The Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, 2001,79(8)
- Wood, W.G. (2001) Hereditary persistence and fetal hemoglobin and $\delta\beta$ thalassemia. In *Disorders of Hemoglobin* (Steinberg, M.H., Forget, B.G., Higgs, D.R., and Nagel, R.L., eds.) pp. 356-388. Cambridge University Press, Cambridge.

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 samples 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.	anti 3.7	-	
2.	-86 C>A	HBB:c.-136C>A	β^+
3.	-29 A>G	HBB:c.-79A>G	β^+
4.	cap+1 A>C	HBB:c.-50A>C	β^+
5.	cap+33 C>G	HBB:c.-18C>G	β^+
6.	cod 7 A>G HbG-San José	HBB:c.23A>G	Hb variants
7.	cod 19 C>A HbD-Ouled Rabah	HBB:c.60C>A	Hb variants
8.	cod 26 G>A HbE	HBB:c.79G>A	Hb variants
9.	cod 47 G>A HbG-Copenaghen	HBB:c.142G>A	Hb variants
10.	cod 104 G>C Hb Camperdown	HBB:c.315G>C	Hb variants
11.	cod 121 G>C HbD-Punjab	HBB:c.364G>C	Hb variants
12.	cod 121 G>A Hb O-Arab	HBB:c.364G>A	Hb variants
13.	cod 126 T>G Hb Neapolis	HBB:c.380T>G	Hb variants
14.	Hb Lepore-BW	NG_000007.3:g.63632_71046del	β^+
15.	Sicilian ($\delta\beta$) ⁰ deletion	NG_000007.3:g.64336_77738del13403	β^0

PRODUCT COMPOSITION

⇒ BOX A (store at -25/-15° C)

Reagents	NLM Code	Quantity	N° Vial
PCR Mix Solution containing oligonucleotides	KA888-n	800 µl	1

⇒ BOX B (store at +2/+8° C)

Reagents	NLM Code	Quantity	N° Vial
Strips Nitrocellulose membrane coated with oligonucleotides	-	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 and 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 the 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
- Disposable aerosol-resistant pipettes tips and 1,5 ml tubes

AREA 2

- Vertical downflow air box
- Dedicated adjustable volume pipettes set
- Disposable 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 ≤ 3° C/sec. For T100 (BioRad) set 4° C/sec as ramp rate.

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	26,6 µl
DNA polymerase (5U/µl), orange cap	0,4 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 **27 µl** of Master Mix in the previously marked 0,2 ml test tubes. Discard the remaining Master Mix.
- Add **3 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) and Magcore (RBCBioscience) before use.

Amplification program

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

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

* for PTC 100 MJ Research, AB9700 (with sample tray only) and EPGradient S set up the annealing temperature to 65° C.

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

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

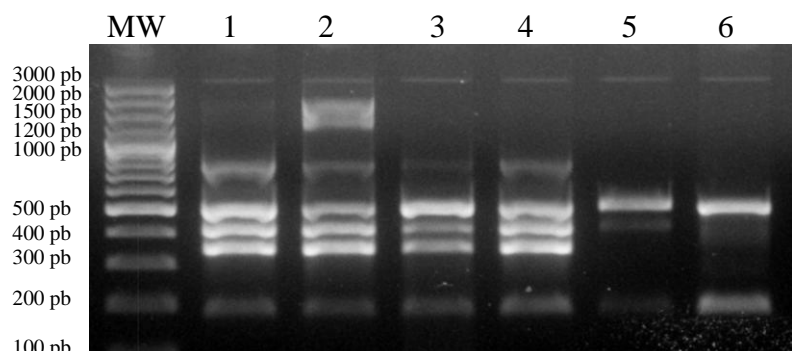
Optional: analyze amplification products by 2% agarose gel containing a DNA intercalating agent.

Mutation	Amplicon Length (bp)
PCR control	182
-86 C>A, -29 A>G, cap+1 A>C, cap+33 C>G, HbG-San José, HbD-Ouled Rabah, HbE	343
HbG-Copenaghen, Hb Camperdown, Hb Lepore-BW	413
HbD-Punjab, Hb O-Arab, Hb Neapolis	506
Amplicons 343pb +413pb	770
Anti 3.7	1700
Sicilian ($\delta\beta$) ⁰	499

Example:

Agarose gel 2%

- 1) Wt
- 2) Anti 3.7
- 3) Hb Lepore-BW eterozygous
- 4) Siciliana($\delta\beta$)⁰ eterozygous
- 5) Hb Lepore-BW homozygous
- 6) Siciliana($\delta\beta$)⁰ homozygous



Warning:

You can also observe the presence of amplified approximately 770 and 1700 bp. The presence or not of these bands does not affect the results.

The amplicon of 1700 bp does not necessarily correspond to anti 3.7.

The amplicon of 182 pb could be not visible with gel

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.

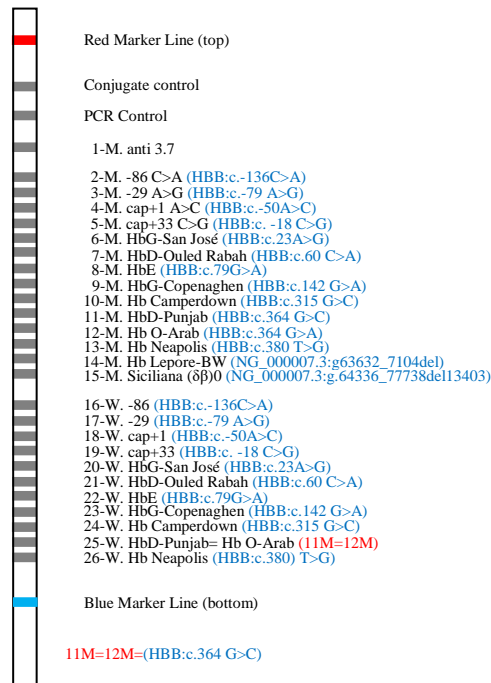
RESULTS INTERPRETATION

The following strip scheme 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



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:

- HbD-Punjab and HbO-Arab, since they affect the same codon, share the wt probe (25-W. Cod.121).

In case of double- heterozygous sample for these two mutations, there is no signal on the corresponding wt.

- For single and double gene deletions, several wild type probes discriminate between the heterozygous and the homozygous mutant state:

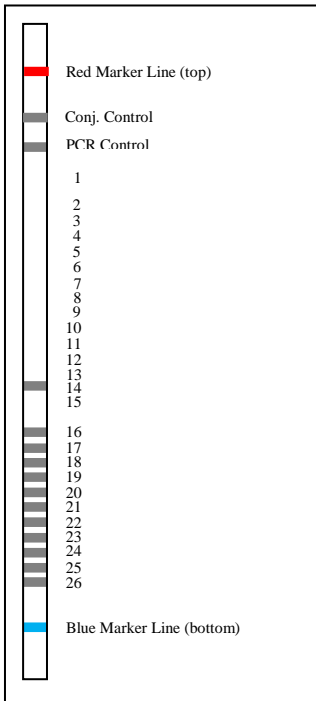
Deletion	Heterozigous	Homozygous mutant
Hb Lepore-BW	All WT signals present	WT signals from 16 to 23 absent
Sicilian ($\delta\beta$) ⁰	All WT signals present	All Wt signals absent

- This kit does not allow to distinguish between the heterozygous and the homozygous mutant state of the anti 3.7 gene triplication.
- Some mutations, because are very close each other on beta-globin gene, share the same wild type probe with mutation investigate with the kit “Beta Globin Test” (AC091).

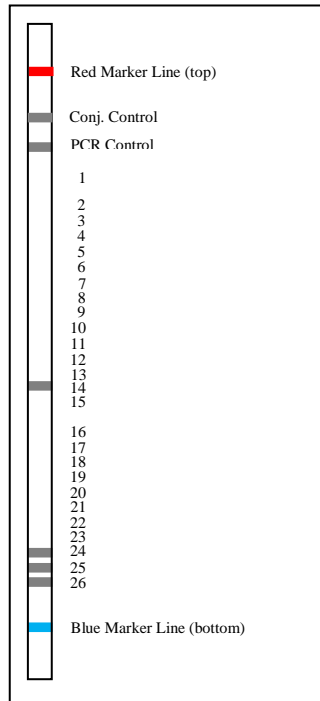
Beta globin test (AC091)	Beta globin plus test (AC104)
-92 C>T, -87C>G	-86 C>A
-30 T>A	-29 A>G
codon 5–CT, codon 6 HbC, codon 6 HbS, codon 6–A, codon 8 –AA, codon 8/9 +G	San José
IVS2.1 G>A	Hb Camperdown

In case of homozygous results for one of these mutations (positive signal on the probe changed and no signal on the corresponding wt), we suggest to test the sample with the kit “Globina Beta test”, as the sample may be a double heterozygote.

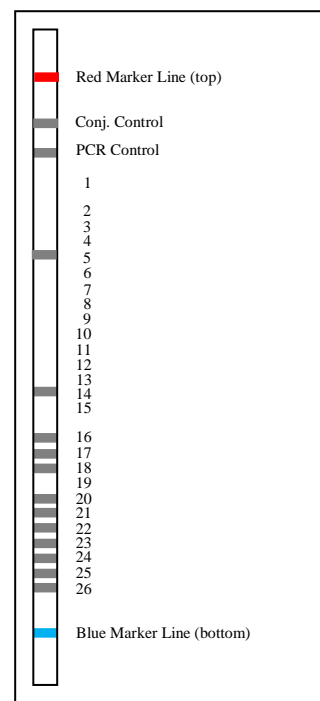
Examples



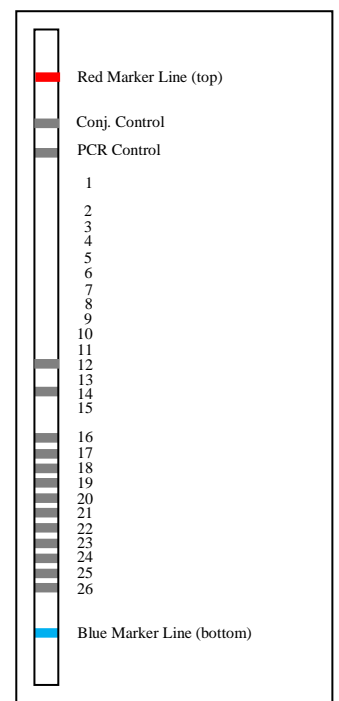
Hb Lepore heterozygous



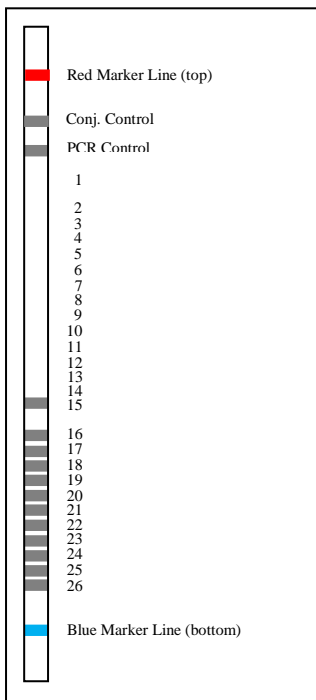
Hb Lepore homozygous



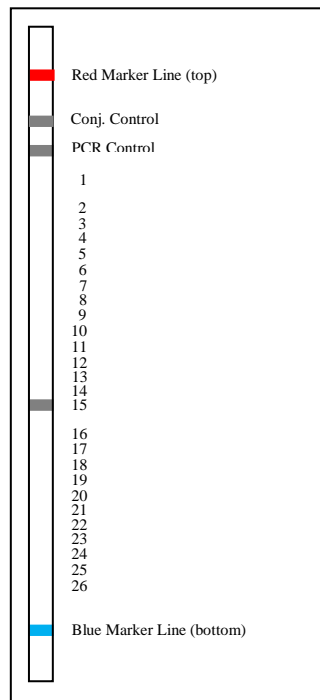
Hb Lepore/cap +33C>G



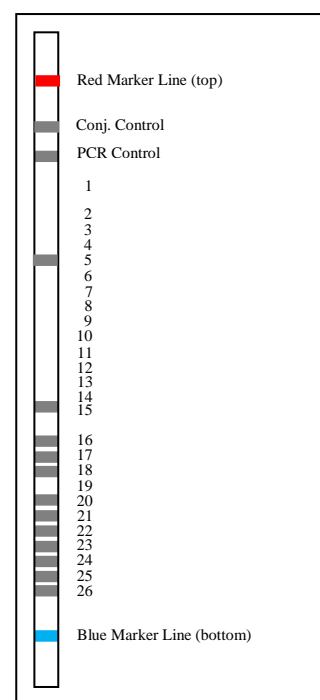
Hb Lepore/Hb O-Arab



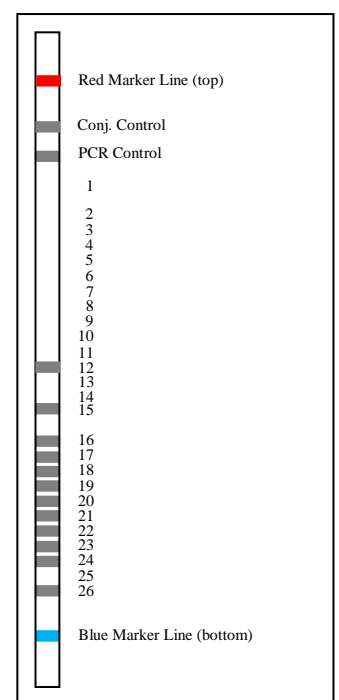
Sicilian ($\delta\beta$)⁰ heterozygous



Sicilian ($\delta\beta$)⁰ homozygous



Sicilian ($\delta\beta$)⁰ /cap +33C>G



Sicilian ($\delta\beta$)⁰ / Hb O-Arab

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 two 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 missing signal on a wt probe can be determined by the presence (in homozygous or double heterozygous) of mutations not investigated by the kit but located on β -globin gene within a few nucleotide of the mutations analyzed. Changes in the nucleotide sequence prevent the amplicon to hybridize to the wt probe.
- 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 that an incorrect combination mix / strip occurred: it has been revealed a sample amplified with BETA GLOBIN TEST (NLM code AC091) on the strips of the BETA GLOBIN TEST PLUS (NLM code AC104). 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 case of a sample homozygous for Sicilian ($\delta\beta$)⁰ deletion, you may see a weak nonspecific signal of wt probes.

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 PLUS" was assessed by analyzing 66 DNA samples positive for the mutations investigated by the kit. We used 59 samples of DNA obtained from whole blood or chorionic villus and 7 synthetic samples.

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

Samples used:

Nr samples	Mutation	HGVS nomenclature
8	anti 3.7	-
2	-86 C>A	HBB:c.-136C>A
4	-29 A>G	HBB:c.-79A>G
3	cap+1 A>C	HBB:c.-50A>C
3	cap+33 C>G	HBB:c.-18C>G
3	cod 7 A>G HbG-San José	HBB:c.23A>G
4	cod 19 C>A HbD-Ouled Rabah	HBB:c.60C>A
5	cod 26 G>A HbE	HBB:c.79G>A
7	cod 47 G>A HbG-Copenaghen	HBB:c.142G>A
3	cod 104 G>C Hb Camperdown	HBB:c.315G>C
6	cod 121 G>C HbD-Punjab	HBB:c.364G>C
3	cod 121 G>A Hb O-Arab	HBB:c.364G>A
4	cod 126 T>G Hb Neapolis	HBB:c.380T>G
6	Hb Lepore-BW	NG_000007.3:g.63632_71046del
5	Sicilian ($\delta\beta$) ⁰ deletion	NG_000007.3:g.64336_77738del13403

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the kit "BETA GLOBIN TEST PLUS", 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 68 samples. No false positive results were obtained. In agreement with these data the specificity of the kit is 100%.

Reproducibility:

INTRA-ASSAY

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

INTER-ASSAY

The reproducibility was assessed by analyzing 4 samples by three different operators. For the tests 4 different lot of the kit were used. Amplification was performed using different thermalcycler.

The tests were performed as described in the method 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.

