

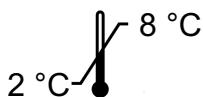
CAH StripAssay[®]

Gebrauchsanweisung

REF



4-380	20 Tests
4-380-A	48 Tests
4-380-TRIAL	5 Tests



IVD



Version: Rev 1.0 / Deutsch
eIFU und weitere Sprachen verfügbar auf
www.viennalab.com

CE 0123



ViennaLab Diagnostics GmbH

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

T: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

W: www.viennalab.com

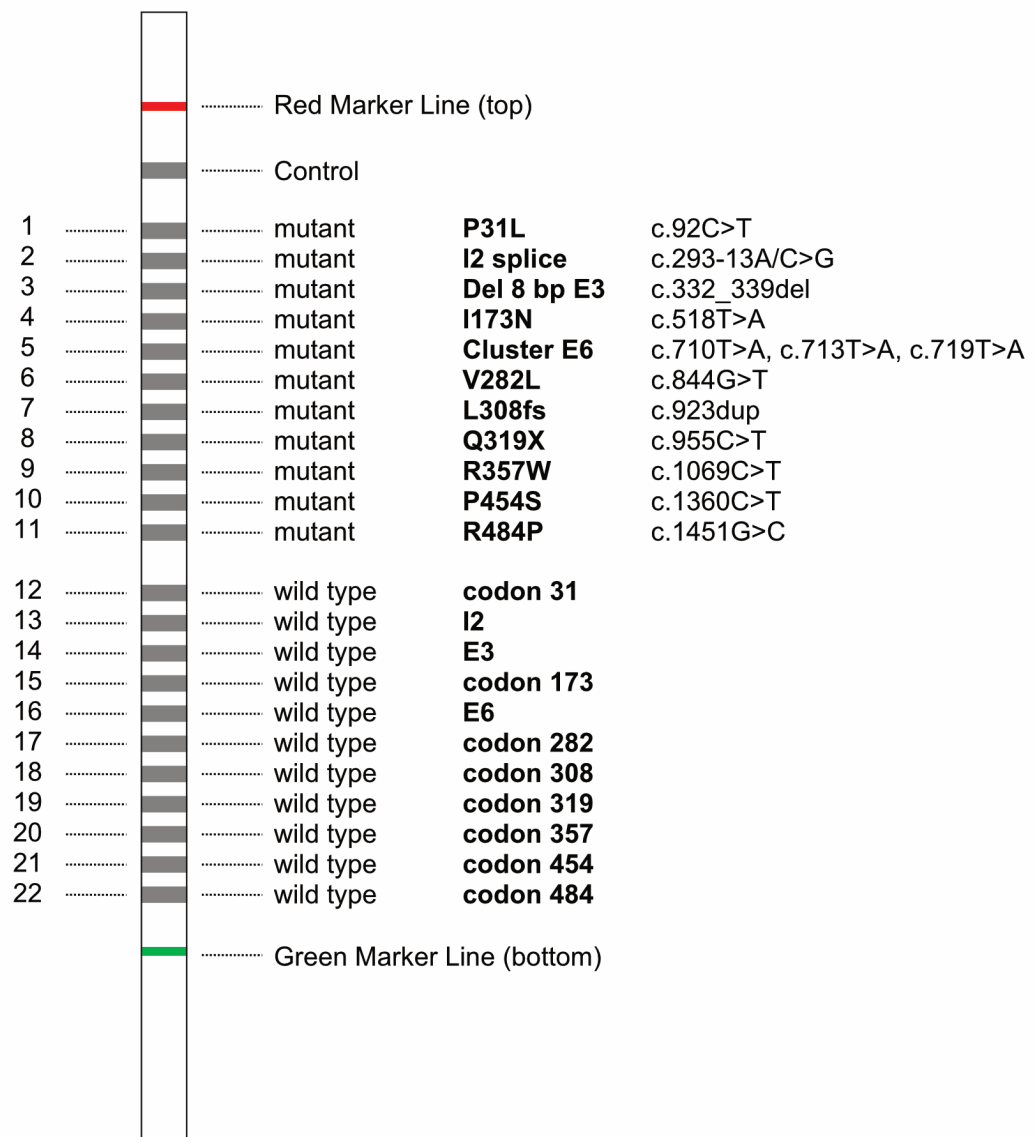
INHALTSVERZEICHNIS

I.	ZWECKBESTIMMUNG	4
II.	HINTERGRUND	4
III.	METHODEN	4
IV.	KIT-BESTANDTEILE	6
V.	ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN	7
VI.	DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS	9
VII.	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	15
VIII.	LEISTUNGSBEWERTUNG	17
IX.	STÖRSUBSTANZEN	17
X.	GRENZEN DES ASSAYS	18
XI.	QUALITÄTSÜBERLEGUNGEN	18
XII.	SICHERHEIT	18
XIII.	TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG	19
XIV.	REFERENZEN	19
XV.	RÜCKMELDUNG AN DEN HERSTELLER	19
XVI.	SYMBOLE	20
XVII.	BEISPIELE VON TESTERGEBNISSEN	21
XVIII.	VERWANDTE PRODUKTE	22

REVISIONSVERLAUF:

Version	Datum	Beschreibung
Rev. 1.0	2022-11	Hinzufügung von mit IVDR verbundenen Inhalten zu Version 2022-01.

Ein Kurzbericht über Sicherheit und Leistung (SSP, Summary of Safety and Performance) des StripAssay® kann von der europäischen Datenbank für Medizinprodukte (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> abgerufen oder beim Hersteller angefordert werden.



EN	DE
mutant	Mutante
wildtype	Wildtyp
control	Kontrolle
red marker line (top)	rote Markierungslinie (oben)
green marker line (bottom)	grüne Markierungslinie (unten)

Abb. 1: Teststrip-Design

Hinweis: Teststrips sind nicht in ihrer tatsächlichen Größe abgebildet und dürfen nicht für die Interpretation von Ergebnissen verwendet werden!

I. ZWECKBESTIMMUNG

Der CAH StripAssay® ist ein qualitativer genetischer Test für die zielgerichtete Analyse von 11 häufigen Mutationen im Gen *CYP21A2*, die das Adrenogenitale Syndrom (CAH, congenital adrenal hyperplasia) verursachen. Die Mutationsanalyse wird an DNA durchgeführt, die aus peripheren Blutproben oder aus Trockenblut extrahiert wird. Der Test wird als Hilfe zur Bestätigung des Vorliegens von *CYP21A2*-Mutationen bei Patienten mit einer CAH-Verdachtsdiagnose und als zusätzlicher Diagnostest im Rahmen von Neugeborenen-Screeningprogrammen verwendet. Der StripAssay® kann entweder manuell oder halbautomatisch durchgeführt werden.

Für die *In-vitro*-Diagnostik in der Humanmedizin.

II. HINTERGRUND

CAH ist eine autosomal-rezessive Funktionsstörung der Nebennierenrinde mit einer Inzidenz von 1:10.000–20.000. In etwa 95 % der Fälle wird diese Erkrankung durch molekulare Defekte im Steroid-21-Hydroxylase-Gen *CYP21A2* verursacht. Die resultierende Störung des Steroidstoffwechsels der Nebennierenrinde ist durch eine unzureichende Biosynthese von Cortisol und Aldosteron gekennzeichnet. Eine Absenkung des Cortisolspiegels bewirkt eine Stimulation der Nebennierenrinde durch Corticotropin (ACTH) und führt zu einer Überproduktion von Steroidvorläufern. Einige dieser Vorläufer werden zur Biosynthese von Sexualhormonen verwendet, was bereits im frühen intrauterinen Leben zu einem Androgenüberschuss führt. Der Phänotyp der CAH korreliert mit dem Schweregrad von *CYP21A2*-Mutationen und beinhaltet die klassische CAH mit Salzverlust (SW-CAH, salt-wasting CAH), die klassische einfach virilisierende CAH (SV-CAH, classic simple-virilizing CAH) sowie milde nicht klassische Formen der Krankheit (NC-CAH, non-classic forms of the disease). Mädchen (46,XX) zeigen bei Geburt unterschiedliche Grade der genitalen Virilisierung, während Knaben (46,XY) unauffällig sein können. In vielen Ländern wurde ein CAH-Neugeborenen-Screening auf Basis der Beurteilung des 17-Hydroxyprogesteronspiegels eingeführt, jedoch weist die Methode eine hohe Falsch-Positiv-Rate auf. Daher stellt die Implementierung zusätzlicher genetischer Tests eine Hilfe für die Diagnose dar und kann Rückrufraten erheblich verringern.

Wichtig!

Der CAH StripAssay® deckt häufige Einzelnukleotid-Varianten und eine kleine Deletion im *CYP21A2*-Gen ab. Zwanzig bis 25 % der pathogenen Varianten sind große *CYP21A2*-Deletionen, -Duplikationen oder chimäre Gene. Daher ist die Beurteilung der *CYP21A2*-Kopienzahlvariation (CNV, copy number variation) für die Diagnose wichtig. Die Kombination des ViennaLab CAH StripAssay® mit dem CAH RealFast™ CNV Assay ermöglicht eine zielgerichtete Analyse des *CYP21A2*-Gens mit einer Detektionsrate von bis zu 94 %.

III. METHODEN

Der CAH StripAssay® basiert auf der Polymerase Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) und reverser Hybridisierung. Das Verfahren beinhaltet drei Schritte: (1) DNA-Isolierung, (2) PCR-Amplifizierung mittels biotinylierten Primern, (3) Hybridisierung der Amplifizierungsprodukte an allelspezifischen Oligonukleotidsonden, welche als parallele Linien auf einem Teststreifen fixiert vorliegen (Abb. 1). Gebundene biotinylierte Sequenzen werden mithilfe von Streptavidin-alkalischer Phosphatase und Farbsubstraten detektiert.

Der CAH StripAssay® detektiert die folgenden Mutationen im *CYP21A2*-Genlocus:

Alter Name				HGVS-Nomenklatur		RefSNP
neu	alt					
1	P31L	(P30L)		c.92C>T	p.Pro31Leu	rs9378251
2	I2 Splice	I2 Splice		c.293-13A/C>G	Splice-Defekt	rs6467
3	Del 8 bp E3	Del 8 bp E3		c.332_339del	p.Gly111fs	rs387906510
4	I173N	(I172N)		c.518T>A	p.Ile173Asn	rs6475
5	Cluster E3	I237N	(I236N)	c.710T>A	p.Ile237Asn	rs111647200
		V238E	(V237E)	c.713T>A	p.Val238Glu	rs12530380
		M240K	(M239K)	c.719T>A	p.Met240Lys	rs6476
6	V282L	(V281L)		c.844G>T	p.Val282Leu	rs6471
7	L308fs	(L307fs)		c.923dup	p.Leu308fs	rs267606756
8	Q319X	(Q318X)		c.955C>T	p.Gln319Ter	rs7755898
9	R357W	(R356W)		c.1069C>T	p.Arg357Trp	rs7769409
10	P454S	(P453S)		c.1360C>T	p.Pro454Ser	rs6445
11	R484P	(R483P)		c.1451G>C	p.Arg484Pro	rs200005406

Referenzsequenz (RefSeq, Reference Sequence):



NM_000500.9

NP_000491.4

Der Test kann manuell oder halbautomatisch mithilfe von Geräten durchgeführt werden, die für die automatisierte Teststrip-Hybridisierung vorgesehen sind (siehe Abschnitt VI. 3.4).

IV. KIT-BESTANDTEILE

REF

	4-380	4-380-A	4-380 -TRIAL
1. Lysis Solution	50 ml	---	50 ml
2. GENXTRACT™ Resin	5 ml	---	5 ml
3a. Amplification Mix A (<i>gelber Verschluss</i>)	500 µl	2 x 500 µl	500 µl
3b. Amplification Mix B (<i>weißer Verschluss</i>)	500 µl	2 x 500 µl	500 µl
3c. Amplification Mix C (<i>grüner Verschluss</i>)	500 µl	2 x 500 µl	500 µl
4. Taq Dilution Buffer (<i>transparenter Verschluss</i>)	500 µl	2 x 500 µl	500 µl
5. HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (<i>roter Verschluss</i>)	175 U	2 x 175 U	125 U
6. DNAT (<i>blauer Verschluss</i>)	1,5 ml	2 x 1,5 ml	1,5 ml
<p> Warnung: DNAT enthält 1,6 % NaOH H315: Verursacht Hautreizungen H319: Verursacht schwere Augenreizung P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen P337 + P313: Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen</p>			
7. Typing Trays	3	---	1
8. Teststrips	20	2 x 24	5
9. Hybridization Buffer (<i>weißer Verschluss</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
10. Wash Solution A (<i>weißer Verschluss</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
11. Conjugate Solution (<i>transparenter Verschluss</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
12. Wash Solution B (<i>transparenter Verschluss</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
13. Color Developer (<i>brauner Verschluss</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Warnung: Color Developer enthält ≤0,4 % Maleinsäure H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen P302 + P352: Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser waschen P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen</p>			
14. Gebrauchsanweisung	1	1	1
15. Collector™ Sheet	1	3	1

Hinweis: Reagenzien bei Nichtgebrauch bei 2 °C bis 8°C lagern!

Name der Komponente	Zusammensetzung
Lysis Solution	hypotonische Lösung, die KHCO ₃ , NH ₄ Cl, EDTA enthält
GENXTRACT™ Resin	Chelex 100 Resin MB in einer gepufferten Lösung
Amplification Mix A	sequenzspezifische 5'-biotinmarkierte Oligonukleotide, eine äquimolare Mischung aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), Ammoniumsulfatpuffer, Glycerol, 0,05 % Natriumazid

Name der Komponente	Zusammensetzung
Amplification Mix B und C	sequenzspezifische 5'-biotinmarkierte Oligonukleotide, eine äquimolare Mischung aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), (NH ₄) ₂ SO ₄ , KCl, 0,05 % Natriumazid
Taq Dilution Buffer	Puffer für HS-Taq DNA Polymerase, mit KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ und MgCl ₂ , 0,05 % Natriumazid
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Hot-Start-Taq DNA Polymerase mit einer Konzentration von 5U/μl
DNAT	Basislösung, die 1,6 % Natriumhydroxid und einen blauen Farbstoff enthält, der eine Veränderung des pH-Werts angibt
Typing Trays	Kunststofftrays mit acht Vertiefungen
Teststrips	allelspezifische Oligonukleotidsonden und eine Hybridisierungskontrolle, immobilisiert als Anordnung paralleler Linien auf einer polyestergestützten Membran, begrenzt durch eine rote Linie oben und eine grüne Linie unten
Hybridization Buffer	Phosphatpuffer mit <2 % Detergens
Wash Solution A	Phosphatpuffer mit <1 % Detergens
Conjugate Solution	Streptavidin-alkalisches Phosphatase-Konjugat verdünnt in einem Puffer auf Kochsalzbasis mit 0,05 % Natriumazid
Wash Solution B	Tris-Puffer, der <2 % Detergens und 0,05 % Natriumazid enthält
Color Developer	Farbsubstrat für die alkalische Phosphatase enthält Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT, nitro blue tetrazolium) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
Gebrauchsanweisung	Papierausdruck
Collector™ Sheet	Papierausdruck

V. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Neben der üblichen molekularbiologischen Laborausstattung ist Folgendes erforderlich:

- Thermoblock oder Thermomixer für 1,5-ml-Reaktionsröhrchen mit Temperaturkontrolle bis 99 °C
- Einstellbare Mikrozentrifuge mit einer Leistung von 3.000–12.000 U/min (1.000–12.000 x g)
- Thermocycler mit beheiztem Deckel (Spezifikation der Heizraten siehe Abschnitt VIII)
- Schüttelwasserbad, mit Deckel und einstellbarer Temperatur (45 °C ± 1 °C)
- Schüttelapparat (Wippschüttler oder Orbitalschüttler)

Optional:

- Vakuumabsauggerät
- Thermoschüttler für Mikrotiterplattenformat mit Deckel und einstellbarer Temperatur ($45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), z. B. PST-60 HL (Biosan) oder gleichwertiges Gerät
- Gerät für die automatische Hybridisierung, einstellbar auf das Zeit-Temperatur-Profil wie in Abschnitt VI beschrieben. 3.4, z. B. DYNABLOT Heat (Dynex) oder gleichwertiges Gerät
- Ausstattung für die Agarose-Gelelektrophorese (für die Kontrolle der Amplifikationsprodukte)

VI. DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS

1. Probenvorbereitung

1.1. DNA-Extraktion aus antikoaguliertem EDTA-Blut

Frisches oder gefrorenes Blut mit EDTA-Antikoagulans verwenden. Blut, das Heparin oder Citrat enthält, wurde nicht getestet. Blut vor Verwendung nicht länger als 3 Tage bei Umgebungstemperatur oder länger als 1 Woche bei 2 °C bis 8 °C lagern. Blut, das mehr als ein Jahr lang eingefroren oder mehr als drei Frost-Tau-Zyklen ausgesetzt war, darf nicht verwendet werden. Bei Probennahme und -transport die Gebrauchsanweisung des EDTA-Blutentnahmeröhrchens und allgemeine Empfehlungen für die Blutentnahme befolgen.

Blutproben auf Raumtemperatur bringen. Durch mehrmaliges sorgfältiges Umdrehen der Blutentnahmeröhrchen gut mischen. Lysis Solution und GENXTRACT™ Resin Raumtemperatur annehmen lassen.

- **100 µl Blutprobe** in ein 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Schraubkappe pipettieren.
- **1 ml Lysis Solution** zugeben, Röhrchen schließen und durch mehrmaliges Umdrehen mischen.
- **15 Min.** bei Raumtemperatur stehen lassen.
- **5 Min.** mit **3.000 U/min** (ca. 1.000 x g) in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.
- Den obersten 1 ml Überstand entfernen und entsorgen.
- **1 ml Lysis Solution** zugeben, Röhrchen schließen und durch mehrmaliges Umdrehen mischen.
- **5 Min.** mit **12.000 U/min** (ca. 12.000 x g) in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.
- Überstand mit Ausnahme von ca. 50 µl eines sichtbaren, weichen Pellets entfernen und entsorgen.
- GENXTRACT™ Resin durch gründliches Schwenken der Flasche erneut suspendieren.
- **200 µl GENXTRACT™ Resin** zum Pellet zugeben. Röhrchen schließen und 10 Sek. vortexen.

Hinweis: GENXTRACT™ Resin setzt sich rasch ab. Die Resuspendierung jedes Mal unmittelbar vor der Entnahme eines weiteren Aliquots wiederholen.

- **20 Min.** bei **56 °C** inkubieren. 10 Sek. vortexen.
- **10 Min.** bei **98 °C** inkubieren. 10 Sek. vortexen.
- **5 Min.** mit **12.000 U/min** in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren. Auf Eis kühlen.

Der resultierende Überstand enthält DNA, die für die sofortige Verwendung in der PCR geeignet ist. Zur weiteren Lagerung sollte der Überstand in ein frisches Röhrchen übertragen und gekühlt (2 °C bis 8°C; bis zu eine Woche) oder bei -30 °C bis -15 °C (für längere Dauer) gefroren aufbewahrt werden.

Der Einsatz anderer Methoden zur DNA-Isolierung mit dem CAH StripAssay® wurde nicht validiert. Sollten andere DNA-Extraktionssysteme verwendet werden, muss die Konzentration und Reinheit der DNA innerhalb eines Bereichs von 2 bis 10 ng/µl mit einem OD_{A260/280}-Verhältnis von 1,7 bis 2,0 liegen. Höhere DNA-Konzentrationen müssen vor PCR-Einsatz auf den empfohlenen Bereich verdünnt werden.

1.2. DNA-Extraktion aus Trockenblut (DBS, Dried Blood Spots)

Bluttropfen mithilfe einer Lanzette aus einem Finger oder der Ferse auf ein absorbierendes Filterpapier nehmen, das für das Neugeborenencreening geeignet ist (Whatman 903 Protein

Saver oder PerkinElmer 226 Filterpapiere). Blut maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur an der Luft trocknen lassen. Für die Langzeit-Archivierung von bis zu einem Jahr DBS bei 2 °C bis 8 °C in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittelsack lagern.

Lysis Solution und GENXTRACT™ Resin auf Raumtemperatur bringen.

- **Zwei gestanzte 3-mm-Scheiben eines DBS** in ein 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Schraubkappe geben.
- **1 ml Lysis Solution** zugeben, Röhrchen schließen und durch mehrmaliges Umdrehen mischen.
- **10 Min.** bei Raumtemperatur stehen lassen.
- **1 Min.** mit **12.000 U/min** (ca. 12.000 x g) in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.
- Überstand vollständig entfernen und entsorgen.
- **1 ml Lysis Solution** zugeben, Röhrchen schließen und durch mehrmaliges Umdrehen mischen.
- **10 Min.** bei Raumtemperatur stehen lassen und durch mehrmaliges Umdrehen mischen.
- **1 Min.** mit **12.000 U/min** in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.
- Überstand vollständig entfernen und entsorgen.
- GENXTRACT™ Resin durch gründliches Schwenken der Flasche resuspendieren.
- **200 µl GENXTRACT™ Resin** zu den ausgestanzten Scheiben zugeben. Röhrchen schließen und durch Klopfen der Röhrchenunterseite vorsichtig mischen. Die ausgestanzten Scheiben sollten vollständig von Resin bedeckt sein.

Hinweis: GENXTRACT™ Resin setzt sich rasch ab. Die Resuspendierung jedes Mal unmittelbar vor der Entnahme eines weiteren Aliquots wiederholen.

- **20 Min.** bei **56 °C** inkubieren.
- **10 Min.** bei **98 °C** inkubieren.
- **5 Min.** mit **12.000 U/min** in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren. Auf Eis kühlen.

Der resultierende Überstand enthält DNA, die für die sofortige Verwendung in der PCR geeignet ist. Zur weiteren Lagerung sollte der Überstand in ein frisches Röhrchen übertragen und gekühlt (2 °C bis 8°C; bis zu eine Woche) oder bei -30 °C bis -15 °C (für längere Dauer) gefroren aufbewahrt werden.

2. In-vitro-Amplifikation (PCR) – 3 getrennte Reaktionen pro Probe

Wichtig: Alle PCR-Reagenzien und Ausgangs-DNA stets gekühlt halten.

- Jedes Mal eine geeignete Menge Arbeitslösung (1:20, Endkonz. 0,25 U/µl) aus **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/µl, roter Verschluss) in **Taq Dilution Buffer** (transparenter Verschluss) für die zu analysierende Anzahl der Proben sowie die **No-template control (NTC)** vorbereiten.

Komponente	pro Reaktion	z. B. 10 Reaktionen
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl	2,5 µl
Taq Dilution Buffer	4,75 µl	47,5 µl
Arbeitslösung	5 µl	50 µl

- Drei Reaktionsröhrchen für jede zu amplifizierende Probe vorbereiten. Die Röhrchen auf Eis legen.
- Für jede Probe 3 endgültige PCR-Reaktionsmischungen (A, B, C) auf Eis vorbereiten:
 - A: **15 µl Amplification Mix A** (gelber Verschluss)
5 µl verdünnte HS-Taq DNA Polymerase (1,25 U)
5 µl Ausgangs-DNA
 - B: **15 µl Amplification Mix B** (weißer Verschluss)
5 µl verdünnte HS-Taq DNA Polymerase (1,25 U)
5 µl Ausgangs-DNA
 - C: **15 µl Amplification Mix C** (grüner Verschluss)
5 µl verdünnte HS-Taq DNA Polymerase (1,25 U)
5 µl Ausgangs-DNA

Hinweis: Es wird empfohlen einen Mastermix für alle Proben vorzubereiten, der Amplification Mix und verdünnte HS-Taq DNA Polymerase enthält. Zuerst 20 µl des Mastermix in jedes PCR-Röhrchen pipettieren und dann Ausgangs-DNA zugeben. In jeden Lauf die No-template control durch Verwendung von PCR-geeignetem Wasser statt DNA (oder bevorzugt die negative Kontrolle Ihrer DNA-Extraktion) inkludieren.

Allgemein Arbeitslösung/Mastermix mit einer überschüssigen Menge von 10 % vorbereiten, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

- Röhrchen fest verschließen. Thermocycler auf 95 °C vorheizen.
- Reaktionsröhrchen einsetzen und das folgende Thermocycling-Programm ausführen:
 - prä-PCR: 95 °C/2 Min.**
 - Thermocycling: 95 °C/30 Sek. – 62 °C/30 Sek. – 72 °C/2:30 Min. (40 Zyklen)**
 - Finale Extension: 72 °C/7 Min.**
- Amplifikationsprodukte auf Eis oder bei 2 °C bis 8 °C für die weitere Verwendung lagern.

Optional: Amplifikationsprodukte durch Gelelektrophorese (z. B. 3 % Agarosegel) analysieren.

Fragmentlängen: 1460 bp (A)
2071 bp (B)
1675 bp (C)

3. Bearbeitung der Teststrips

3.1. Hybridisierung (manuell) – 1 Teststrip pro Probe (45 °C, Wasserbadschüttler)

Wichtig: Wasserstand des Wasserbads ungefähr auf die halbe Höhe des Typing Trays einstellen. Wasserbad auf exakt 45 °C erhitzen. Wassertemperatur mit einem kalibrierten Thermometer prüfen. Hybridization Buffer und Wash Solution A auf 45 °C vorwärmen. Darauf achten, dass sich alle bei 2 °C bis 8 °C gebildeten Präzipitate vollständig aufgelöst haben. Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B und Color Developer auf Raumtemperatur bringen. Typing Tray(s) vorbereiten.

Einen Teststrip für jede Probe mit einer sauberen Pinzette entfernen. Teststrips nur mit puderfreien Handschuhen berühren! Teststrips außerhalb der Markierungslinien mit einem Bleistift beschriften (keine Kugelschreiber, Marker usw.).

- **40 µl DNAT** (blauer Verschluss) in die untere Ecke jeder Vertiefung, die in den Typing Trays verwendet werden soll, pipettieren (eine Vertiefung pro Probe).
- **20 µl Amplifizierungsprodukt A** in den entsprechenden Tropfen DNAT pipettieren.
- **20 µl Amplifizierungsprodukt B** in denselben Tropfen pipettieren.
- **20 µl Amplifizierungsprodukt C** in denselben Tropfen pipettieren.
- Mit einer Pipette gründlich mischen. (Die Lösung bleibt blau.)
- **5 Min.** bei Raumtemperatur stehen lassen.
- **1 ml Hybridization Buffer** (vorgewärmt auf 45 °C) in jede Vertiefung geben. Tray vorsichtig schütteln. (Die blaue Farbe verschwindet.)
- **Teststrips** mit markierter Seite nach oben (Linien sichtbar!) in die jeweiligen Vertiefungen legen. Vollständig eintauchen.
- **30 Min.** bei **45 °C** auf dem Schütteltisch des Wasserbads inkubieren.

Mittlere Schüttelfrequenz (ca. 50 U/min) einstellen, um ein Verschütten zu vermeiden. Abdeckung des Wasserbads geschlossen halten, um Temperaturschwankungen zu vermeiden.

- Am Ende der Inkubation Hybridisierungslösung durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.

Umgehend fortfahren. Teststrips während des gesamten Verfahrens nicht austrocknen lassen.

3.2. Stringentes Waschen (45 °C, Wasserbadschüttler)

- **1 ml Wash Solution A** (vorgewärmt auf 45 °C) zugeben. Kurz spülen (10 Sek.). Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution A** (45 °C) zugeben.
- **15 Min.** bei **45 °C** im Wasserbadschüttler inkubieren. Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution A** (45 °C) zugeben.
- **15 Min.** bei **45 °C** im Wasserbadschüttler inkubieren. Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.

3.3. Kolorimetrische Detektion (Raumtemperatur, 22 °C ± 3 °C)

- **1 ml Conjugate Solution** zugeben.
- **15 Min.** bei **Raumtemperatur** auf einem Wippschüttler oder Orbitalschüttler inkubieren. Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution B** zugeben. Kurz spülen (10 Sek.). Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution B** zugeben.
- **5 Min.** bei **Raumtemperatur** auf einem Wippschüttler oder Orbitalschüttler inkubieren. Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution B** zugeben.
- **5 Min.** bei **Raumtemperatur** auf einem Wippschüttler oder Orbitalschüttler inkubieren. Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Color Developer** zugeben.
- **15 Min.** bei **Raumtemperatur** im Dunkeln auf einem Wippschüttler oder Orbitalschüttler inkubieren.
Bei positiver Reaktion erscheint eine violette Verfärbung.
- Teststrips mehrmals mit destilliertem Wasser waschen.
Strips im Dunkeln auf absorbierendem Papier trocknen lassen.

Teststrips nach der Farbentwicklung keinem intensiven Licht aussetzen.

3.4. Hybridisierung (automatisch) – optional statt Wasserbad und Schüttelapparat

Ein Gerät für die automatische Verarbeitung von Teststrips muss die folgenden Anforderungen erfüllen:

- Programmierbares Temperatur- und Zeitprofil gemäß Abschnitt 3.1 bis 3.3 des StripAssay®-Verfahrens.
- Integrierte Vorheizstation für Hybridization Buffer und Wash Solution A.
- Temperaturkontrolle der Trays während der Hybridisierungs- und stringenten Waschschrte bei 45 °C ± 1 °C.
- Aktives Kühlsystem für das Tray, um eine rasche Temperaturverringerng für kolorimetrische Detektionsschritte bei Raumtemperatur sicherzustellen.
- Schüttler für Tray.
- Beheizter Deckel für das Tray, um eine Verdunstung der Reagenzien während der Inkubation zu vermeiden.
- Abgabe definierter Reagenzienvolumen.
- Absaugung von Reagenzien.
- Abhängig vom verwendeten Gerät und von der Anzahl der in einem Lauf verarbeiteten Proben können zusätzliche Reagenzien erforderlich sein. Separate StripAssay® Detection Reagents sind für 20 Tests (REF CS-012) und 48 Tests (REF CS-017) erhältlich.

VII. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Der Genotyp der Probe wird mithilfe des beigefügten Collector™ Sheet bestimmt. Teststrip in die gekennzeichneten Felder legen, gemäß der schematischen Darstellung unter Verwendung der roten Markierungslinie (oben) und der grünen Markierungslinie (unten) ausrichten und mit Klebeband fixieren.

Eine positive Reaktion der obersten Kontrolllinie gibt die korrekte Funktion der Conjugate Solution und des Color Developer an. Diese Linie sollte immer eine positive Verfärbung aufweisen.

Für jede polymorphe Position sollte eines der folgenden Verfärbungsmuster (Abb. 2) entstehen:

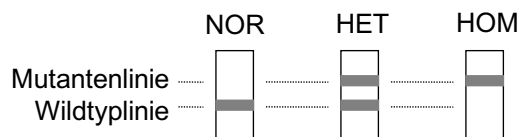


Abb. 2: Genotypen – Färbungsmuster auf Teststrip

	Wildtyplinie	Mutantenlinie	Genotyp
NOR	positiv	negativ	normal
HET	positiv	positiv	heterozygot
HOM	negativ	positiv	homozygot mutiert

Hinweis: Färbeintensitäten positiver Linien können variieren. Dies ist für das Ergebnis nicht von Bedeutung.

Siehe Beispiele der StripAssay®-Ergebnisse auf Seite 21 (Abb. 3).

Deletionen und Duplikationen des *CYP21A2*-Gens oder große Konversionen zwischen dem funktionalen Gen und seinem hoch homologen Pseudogen (*CYP21A1P*) umfassen etwa 30 Prozent der genetischen Veränderungen, die bei CAH-Patienten auftreten. Es wird daher immer empfohlen, die Ergebnisse des CAH StripAssay® mit Daten zur *CYP21A2*-Genkopienzahl zu kombinieren, zum Beispiel durch den ViennaLab CAH RealFast™ CNV Assay (REF 7-410) oder durch multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). In bestimmten Fällen können ungewöhnliche StripAssay®-Muster auf solche Konversionen hindeuten (z. B. die häufige „30 kb E1-E3 Deletion“; siehe Beispiele E-H, Seite 21).

Der CAH StripAssay® unterscheidet nicht zwischen einer homozygoten Mutation (an beiden Allelen vorhanden) und einer hemizygoten Mutation (Deletion am zweiten Allel vorhanden; siehe Beispiele C, H und K, Seite 21).

Um das funktionelle *CYP21A2*-Gen zu amplifizieren, mussten einige Primer so gewählt werden, dass sie in potenziell mutierten Regionen liegen. Daher beeinträchtigt das Vorhandensein der Cluster E6-Mutation die Amplifikation der Region, die sich über P31L und I2 Splice erstreckt. Falls eine dieser Mutationen in Kombination mit Cluster E6 vorhanden ist, erscheint diese als

pseudo-homozygot (siehe Beispiel J, Seite 21). Falls Cluster E6 im homozygoten oder hemizygoten Zustand vorhanden ist, fehlen die Wildtypsignale für P31L und I2 Splice (siehe Beispiel K, Seite 21).

Wie bei jedem diagnostischen Test müssen die Ergebnisse des CAH StripAssay® im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Phänotyp des Patienten und anderen medizinischen Untersuchungen interpretiert werden, die dem Arzt zur Verfügung stehen. ViennaLab Diagnostics GmbH übernimmt keine Verantwortung für getroffene klinische Entscheidungen.

VIII. LEISTUNGSBEWERTUNG

Die **Genauigkeit** des CAH StripAssay® wurde durch Analyse von 271 vortypisierten genomischen DNA-Proben bestimmt. Die Ergebnisse stimmten vollständig mit der Referenzmethode Sanger-Sequenzierung und der MLPA überein. Der Assay wies in 201 Proben eine oder mehrere Mutationen (= 100 % positive prozentuale Übereinstimmung) und in 70 Proben keine Mutation korrekt nach (= 100 % negative prozentuale Übereinstimmung).

Die **Präzision** des CAH StripAssay® wurde als Variabilität zwischen Replikaten, Anwendern, Tagen, Thermocyclern, Hybridisierungsgeräten, Probenmaterial (Vollblut, Trockenblut) und DNA-Extraktionskits bewertet. Bei insgesamt 78 Tests, die unter den untersuchten Parametern durchgeführt wurden, zeigten alle Tests die erwarteten Genotypisierungsergebnisse. Es waren lediglich vernachlässigbare Unterschiede in den Färbungsintensitäten der Teststrips sichtbar und es wurde keine Hintergrundfärbung beobachtet. Der CAH StripAssay® wurde am AB GeneAmp® PCR-System 2700, MJ Research PTC-200 und Eppendorf Mastercycler X50s validiert, die eine Heiz- und Kühlrate im Bereich von 1,7 bis 6,3 °C/Sek. bzw. 1,4 bis 3,7 °C/Sek. aufweisen.

Die Verwendung anderer Thermocycler muss vom Anwender verifiziert werden.

Die **analytische Spezifität** wird vor allem durch Auswahl genspezifischer Primer und allelspezifischer Sonden sowie Auswahl stringenter Reaktionsbedingungen sichergestellt. Die Primer und Sonden wurden mittels Sequenzvergleichsanalyse auf mögliche Homologien mit allen in Gendatenbanken veröffentlichten Sequenzen geprüft. Dadurch wurde die Detektierbarkeit aller relevanten Genotypen sichergestellt. Eine potentielle Kreuzreaktivität zwischen Sonden wurde mit synthetischer DNA, die das jeweilige Genfragment enthält, verifiziert. Es wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet.

Klinische Leistung: Die Beurteilung der klinischen Leistung des CAH StripAssay® zur Unterstützung des klinischen Nachweises umfasste eine systematische Prüfung der verfügbaren Daten und anwendbaren Elemente. Als Ergebnis der Literatursuche wurden drei Publikationen identifiziert, die sich mit der Sicherheit und Leistung des CAH StripAssay® befassen und den klinischen Nutzen des Assays belegen. Zu den Veröffentlichungen gehörte eine multizentrische Studie, die über die Entwicklung und Validierung des CAH StripAssay® an 271 Patientenproben berichtet (Németh et al., Clin Chim Acta. 24. Dez. 2012;414:211-4). In Methodenvergleichsstudien wurden keine unerwünschten Vorkommnisse oder Abweichungen identifiziert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die klinische Leistung, der Nutzen und die Sicherheit des CAH StripAssay® bestätigt werden, wenn der Assay wie vorgesehen zur Bestätigungsdiagnose der kongenitalen Nebennierenhyperplasie verwendet wird.

IX. STÖRSUBSTANZEN

Fünf Störsubstanzen (Hämoglobin, Immunglobulin G, Spuren von Blut, Ethanol und EDTA), die potenziell in DNA-Präparationen aus EDTA-Blut vorhanden sind, wurden getestet. Ihre Auswirkungen auf die PCR wurden in drei gereinigten DNA-Proben, die mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen versetzt waren, bewertet und mit den Kontrollen ohne Zusatz von Störsubstanzen verglichen. Alle Proben wurden dreifach analysiert.

Eine Endkonzentration von <10 µM Hämoglobin, 0,1 µM Immunglobulin G, <1 % peripherem Blut, 1,25 % Ethanol oder 0,1 mM EDTA in der Reaktion beeinträchtigte die Leistung des StripAssay® nicht.

X. GRENZEN DES ASSAYS

Der CAH StripAssay® ist ausschließlich für die Diagnose der 11 in Abschnitt III aufgelisteten Mutationen vorgesehen, die durch allelspezifische Sonden auf den Teststrips repräsentiert werden. Andere *CYP21A2*-Punktmutationen, Deletionen oder Konversionen, die in der Probe eines Patienten vorhanden sein können, können nicht detektiert werden.

Der Assay soll das gesamte *CYP21A2*-Gen in drei überlappenden Fragmenten unter Verwendung biotinylierter PCR-Primerpaare amplifizieren, die das hoch homologe Pseudogen *CYP21A1P* nicht ko-amplifizieren können. Fragment A umfasst die Region von Exon 1 bis 6, während Fragmente B und C von Exon 3 bis 10 bzw. Exon 5 bis 10 umfassen. Fusionen des aktiven Gens und des Pseudogens, so genannte *CYP21A1P/CYP21A2*-Chimären mit Verbindungsstellen, die Cluster E6 nachgelagert sind, sowie komplette *CYP21A2*-Deletionen verursachen einen teilweisen PCR-Ausfall und nur das Allel, das eine Wildtypsequenz oder eine Punktmutation trägt, wird amplifiziert. Im letzteren Fall erscheinen die Mutationen als pseudo-homozygot, obwohl sie eigentlich hemizygot sind. Für eine umfassende Analyse ist es daher nötig, die *CYP21A*-Kopienzahlvariation mithilfe einer ergänzenden Methode (z. B. ViennaLab CAH RealFast™ CNV Assay) zu bestimmen.

Seltene oder private Varianten innerhalb der Primer- oder Sonden-Bindungsstellen sowie Deletionen oder Genkonversionen können zu Amplifizierungsfehlern und fehlenden Signalen auf den Teststrips führen.

Der CAH StripAssay® darf nicht für den Zweck der Pränataldiagnostik oder Präimplantationsdiagnostik verwendet werden. Der Assay wurde nicht an Proben aus Chorionzottenbiopsie, Fruchtwasserpunktion oder Nabelschnurblut validiert.

Der CAH StripAssay® ist nur für die professionelle Verwendung in Labors gedacht.

XI. QUALITÄTSÜBERLEGUNGEN

- Ein gründliches Verständnis des hier beschriebenen Verfahrens sowie Standard-Labortechniken und geeignete Ausstattung sind erforderlich, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.
- StripAssay®-Kits dürfen nicht über ihr Ablaufdatum hinaus verwendet werden.
- Nach dem ersten Öffnen der Primärverpackung sind StripAssay®-Reagenzien bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2 °C bis 8 °C bis zu dem auf dem Außenetikett des Kits aufgedruckten Ablaufdatum stabil.
- Sterile Einweg-Pipettenspitzen mit Filter verwenden, um eine mikrobielle Kontamination und Kreuzkontamination von Reagenzien und Proben zu vermeiden. Flaschenverschlüsse nicht austauschen.
- Nur für den Einmalgebrauch.

XII. SICHERHEIT

- In den vorgesehenen Arbeitsräumen ist Essen, Trinken und Rauchen sowie die Anwendung von Kosmetika untersagt. Tragen Sie Labormäntel und Einweghandschuhe, wenn Sie Proben und Reagenzien handhaben. Waschen Sie sich anschließend gründlich die Hände.
- Behandeln Sie Proben als potentiell infektiös. Säubern und desinfizieren Sie alle Materialien und Oberflächen, die mit Proben in Kontakt sind, gründlich. Entsorgen Sie sämtlichen Müll in Zusammenhang mit klinischen Proben in spezielle Müllcontainer für biologische Risikoabfälle.

- Bringen Sie DNAT und Color Developer nicht in Berührung mit Haut, Augen und Schleimhäuten. Falls dennoch Kontakt erfolgt, waschen Sie es sofort mit viel Wasser ab. Sollten Sie DNAT verschütten, verdünnen Sie es vor dem Aufwischen mit Wasser.
- Befolgen Sie alle gültigen lokalen und staatlichen Sicherheits- und Umweltbestimmungen.

XIII. TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Technische Unterstützung erhalten Sie durch:

- Ihren ViennaLab Diagnostics-Händler vor Ort (www.viennalab.com/distribution)
- Videotutorials (www.viennalab.com/support)
- das StripAssay® Manual (www.viennalab.com/support)
- den StripAssay® Troubleshooting Guide (www.viennalab.com/support)
- Kontaktieren von techhelp@viennalab.com













XIV. REFERENZEN

- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man (www.omim.org)
- Németh et al. Clin Chim Acta 2012; 24;414:211-4

XV. RÜCKMELDUNG AN DEN HERSTELLER

Alle schwerwiegenden Vorkommnisse, die in Verbindung mit dem StripAssay® aufgetreten sind, müssen der zuständigen Behörde des jeweiligen Landes und dem Hersteller gemeldet werden.

XVI. SYMBOLE

	Katalognummer
	Chargencode
	<i>In-vitro</i> -Diagnostika
	Entspricht der europäischen IVD-Bestimmung 2017/746
	Identifikationsnummer der benannten Stelle
	Ausreichend für <n> Tests
	Temperaturgrenzwerte für die Lagerung
	Zu verwenden bis
	Vorsicht
	Hersteller
	Herstellungsdatum
	Siehe Gebrauchsanweisung

XVII. BEISPIELE VON TESTERGEBNISSEN

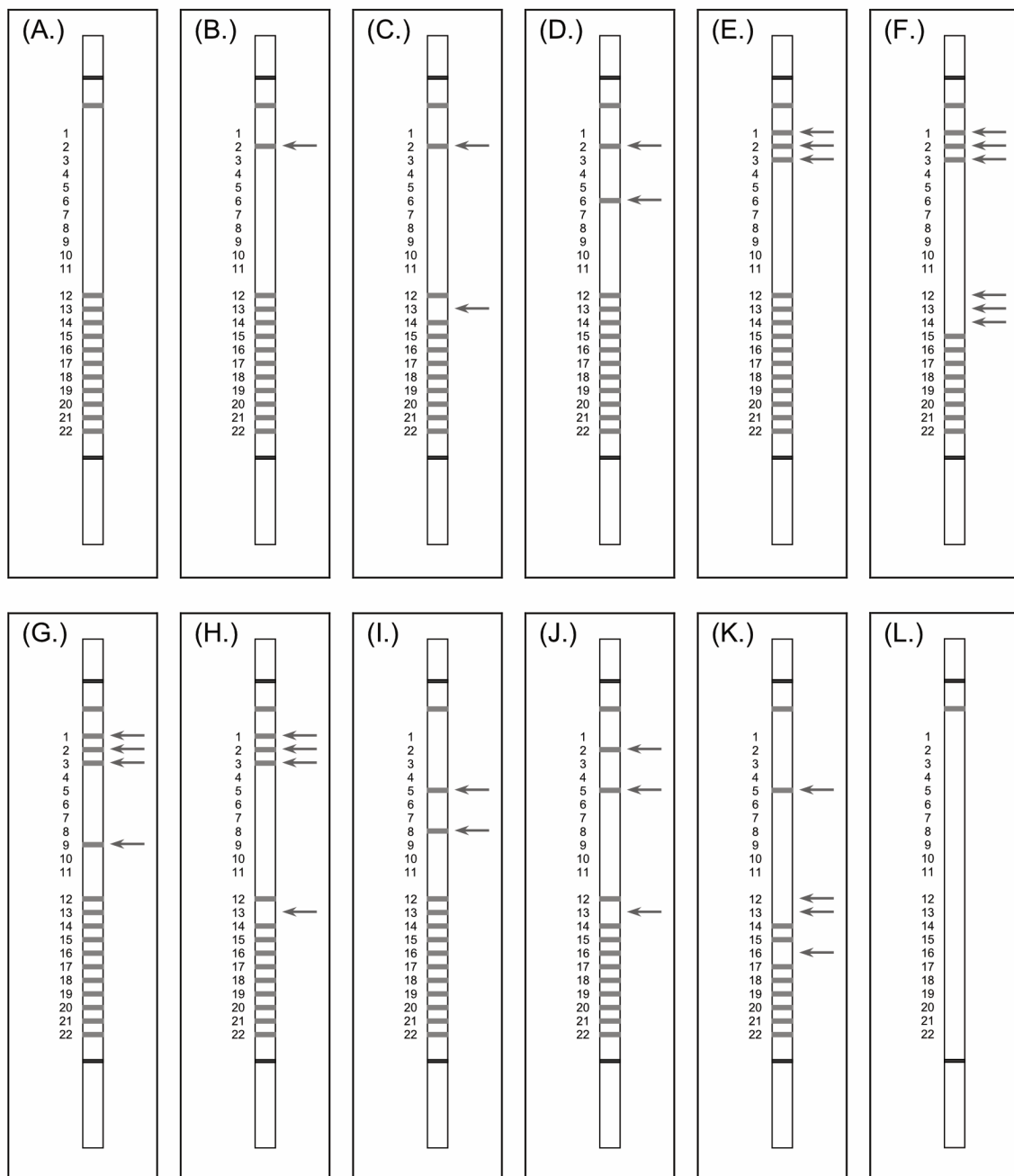


Abb. 3: Beispiele der mit dem CAH StripAssay® erhaltenen Ergebnisse

- (A.) normal
- (B.) I2 Splice heterozygot
- (C.) I2 Splice homozygot oder hemizygot
- (D.) I2 Splice – V282L heterozygot
- (E.) P31L – I2 Splice - Del 8 bp heterozygot (heterozygot „30 kb E1-E3 Deletion“)
- (F.) P31L – I2 Splice - Del 8 bp homozygot (homozygot „30 kb E1-E3 Deletion“)
- (G.) P31L – I2 Splice - Del 8 bp – R357W heterozygot (E1–E3 Del – R357W)
- (H.) P31L – Del 8 bp heterozygot, I2 Splice hemizygot (E1–E3 Del – I2 Splice)
- (I.) Cluster E6 – Q319X heterozygot
- (J.) Cluster E6 – I2 Splice heterozygot
- (K.) Cluster E6 homozygot oder hemizygot
- (L.) E1-E6 homozygote Deletion oder negative Kontrolle oder PCR-Versagen

XVIII. VERWANDTE PRODUKTE

REF



7-410	CAH RealFast™ CNV Assay	100 Reaktionen
CS-012	StripAssay® Detection Reagents	20 Tests
CS-017	StripAssay® Detection Reagents 48	48 Tests
2-014	GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System	100 Extraktionen
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 Extraktionen
6-080	Typing Trays	5

Händler:



Hersteller:



ViennaLab Diagnostics GmbH

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

T: +43 1 8120156-0

E: info@viennalab.com

W: www.viennalab.com