

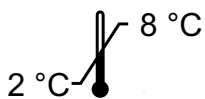
CF StripAssay[®] GER

Gebrauchsanweisung

REF



4-430	10 Tests
4-430-A	24 Tests
4-430-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 8

VII. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE 13

VIII. LEISTUNGSBEWERTUNG 15

IX. STÖRSUBSTANZEN 16

X. GRENZEN DES ASSAYS 16

XI. QUALITÄTSÜBERLEGUNGEN 16

XII. SICHERHEIT 17

XIII. TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG 17

XIV. REFERENZEN 17

XV. RÜCKMELDUNG AN DEN HERSTELLER 17

XVI. SYMBOLE 18

XVII. BEISPIELE DER TESTERGEBNISSE 19

XVIII. VERWANDTE PRODUKTE 20

REVISIONSVERLAUF:

Version	Datum	Beschreibung
Rev. 1.0	2022-11	Hinzufügung von mit IVDR verbundenen Inhalten zu Version 2020-01.

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.

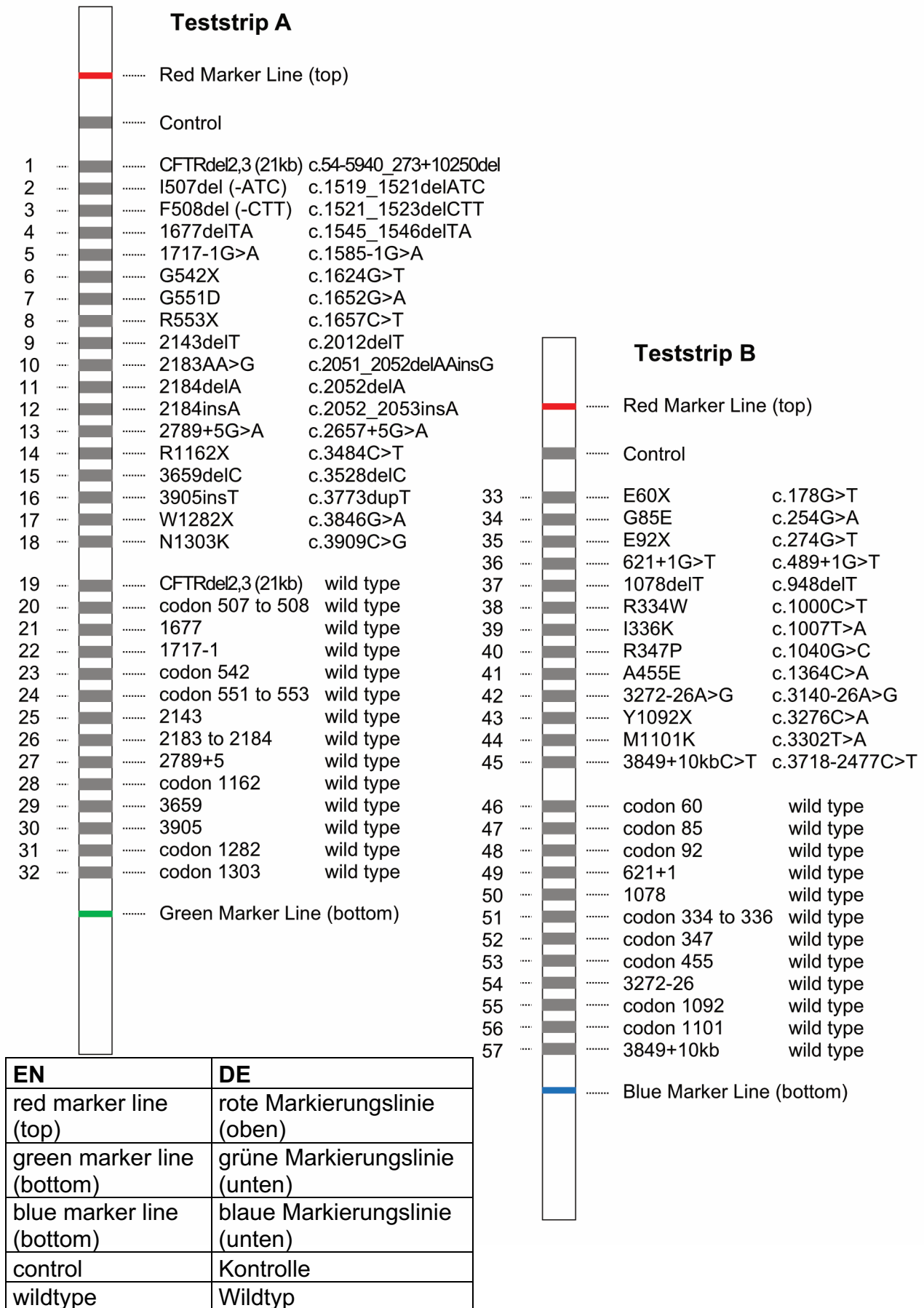


Abb. 1: Teststrip-Design

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

I. ZWECKBESTIMMUNG

Der CF StripAssay® ist ein qualitativer Assay für die zielgerichtete Analyse von häufigen Mutationen im *Zystische Fibrose-Transmembran-Regulator-(CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)*-Gen. Die Mutationsanalyse wird an DNA durchgeführt, die aus peripheren Blutproben oder aus Trockenblut extrahiert wird. Der Test wird als Hilfe zur genetischen Bestätigung des Vorliegens von zwei CFTR-Mutationen bei Patienten mit einer CF-Verdachtsdiagnose (zystische Fibrose) und als zusätzlicher oder dritter Diagnosetest im Rahmen von Neugeborenen-Screeningprogrammen verwendet. Der CF StripAssay® kann für das Screening des Trägerstatus von CFTR-Mutationen bei Verwandten eines betroffenen Patienten oder bei Erwachsenen im reproduktiven Alter sowie in der allgemeinen Bevölkerung verwendet werden. Der CF StripAssay® GER deckt die 31 CFTR-Mutationen ab, die beim Neugeborenen-Screeningprogramm in Deutschland gefordert werden. Der StripAssay® kann entweder manuell oder halbautomatisch durchgeführt werden.

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

II. HINTERGRUND

Zystische Fibrose (CF) ist eine komplexe Multi-Organ-Erkrankung, die durch Mutationen im *CFTR*-Gen vererbt wird, die die Struktur, Funktion oder Produktion des codierten Chloridkanalproteins ändern. Sie ist eine sehr häufige autosomal-rezessive Erkrankung, die das Lungen-, Pankreas-, Magen-Darm- oder reproduktive System betrifft. Leichtere, mit CFTR verbundene Erkrankungen sind monosymptomatische klinische Entitäten, die mit einer CFTR-Dysfunktion assoziiert sind, z. B. kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens (CBAVD, Congenital bilateral aplasia of vas deferens), disseminierte Bronchiektase oder chronische Pankreatitis, die die Diagnosekriterien für CF nicht erfüllen. CBAVD ist eine häufige Ursache männlicher Unfruchtbarkeit bei zystischer Fibrose.

III. METHODEN

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



Der CF StripAssay® GER detektiert 31 häufige Mutationen im *CFTR*-Gen:

	Alter Name	HGVS-Nomenklatur	RefSNP
1	CFTRdele2,3(21kb)	c.54-5940_273+10250del	--
2	E60X	c.178G>T	rs77284892
3	G85E	c.254G>A	rs75961395
4	E92X	c.274G>T	rs121908751
5	621+1G>T	c.489+1G>T	rs78756941
6	1078delT	c.948delT	rs121908744
7	R334W	c.1000C>T	rs121909011
8	I336K	c.1007T>A	rs397508721
9	R347P	c.1040G>C	rs77932196
10	A455E	c.1364C>A	rs74551128
11	I507del	c.1519_1521delATC	rs121908745
12	F508del	c.1521_1523delCTT	rs113993960
13	1677delTA	c.1545_1546delTA	rs121908776
14	1717-1G>A	c.1585-1G>A	rs76713772
15	G542X	c.1624G>T	rs113993959
16	G551D	c.1652G>A	rs75527207
17	R553X	c.1657C>T	rs74597325
18	2143delT	c.2012delT	rs121908812
19	2183AA->G	c.2051_2052delAAinsG	rs121908799
20	2184delA	c.2052delA	rs121908746
21	2184insA	c.2052dupA	rs121908786
22	2789+5G>A	c.2657+5G>A	rs80224560
23	3272-26A>G	c.3140-26A>G	rs76151804
24	Y1092X (C>A)	c.3276C>A	rs121908761
25	M1101K	c.3302T>A	rs36210737
26	R1162X	c.3484C>T	rs74767530
27	3659delC	c.3528delC	rs121908747
28	3849+10kb C>T	c.3718-2477C>T	rs75039782
29	3905 insT	c.3773dupT	rs121908789
30	W1282X	c.3846G>A	rs77010898
31	N1303K	c.3909C>G	rs80034486

Referenzsequenz (RefSeq, Reference Sequence): NM_000492.3

IV. KIT-BESTANDTEILE

REF

	4-430	4-430-A	4-430 -TRIAL
1. Lysis Solution	50 ml	---	50 ml
2. GENXTRACT™ Resin	5 ml	---	5 ml
3a. Amplification Mix A (<i>gelber Verschluss</i>)	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
3b. Amplification Mix B (<i>grüner Verschluss</i>)	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
4. Taq Dilution Buffer (<i>transparenter Verschluss</i>)	500 µl	500 µl	500 µl
5. HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (<i>roter Verschluss</i>)	125 U	175 U	125 U
6. DNAT (<i>blauer Verschluss</i>)	1,5 ml	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	---	2
8a. Teststrips A (<i>schwarzer Verschluss</i>)	10	24	5
8b. Teststrips B (<i>weißer Verschluss</i>)	10	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/B	Sequenzspezifische 5'-biotinmarkierte Oligonukleotide, eine äquimolare Mischung aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), MgCl ₂ , Ammoniumsulfatpuffer, Betain, 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 5 U/µl

Name der Komponente	Zusammensetzung
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 A/B	Allelspezifische Oligonukleotidsonden, Kontrolle für positive PCR-Reaktion und eine Hybridisierungskontrolle, immobilisiert als Anordnung paralleler Linien auf einer polyestergetragenen Membran, begrenzt durch eine rote Linie oben und eine grüne (Teststrip A) oder blaue (Teststrip B) 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)
- Wasserbad mit Schütteltisch, Deckel und einstellbarer Temperatur (45 °C ± 1 °C)
- Schüttelapparat (Wippschüttler oder Orbitalschüttler)

Optional:

- Vakuumabsauggerät
- Thermoschüttler für Mikrotiterplattenformat mit Deckel und einstellbarer Temperatur (45 °C ± 1 °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 auf Raumtemperatur bringen.

- **100 µl Blutprobe** in ein 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Schraubkappe pipettieren.
- **1 ml Lysis Solution** zugeben, Röhrchen schließen und durch mehrmaliges Invertieren 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 des Überstands entfernen und entsorgen.
- **1 ml Lysis Solution** zugeben, Röhrchen schließen und durch mehrmaliges Invertieren 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 resuspendieren.
- **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 CF StripAssay® GER 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 3 mm Punches eines DBS** in ein 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Schraubkappe geben.
- **1 ml Lysis Solution** zugeben, Röhrchen schließen und durch mehrmaliges Invertieren 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 Invertieren mischen.
- **10 Min.** bei Raumtemperatur stehen lassen und durch mehrmaliges Invertieren 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 gefroren bei -30 °C bis -15 °C (für längere Dauer) werden.

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

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

- Jedes Mal eine geeignete Menge Arbeitslösung (1:25, Endkonz. 0,2 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)	0,2 µl	2 µl
Taq Dilution Buffer	4,8 µl	48 µl
Arbeitslösung	5 µl	50 µl

- Zwei Reaktionsröhrchen für jede zu amplifizierende Probe vorbereiten. Die Röhrchen auf Eis legen.
- Für jede Probe 2 endgültige PCR-Reaktionsmischungen (A und B) auf Eis vorbereiten:
 - A: **15 µl Amplification Mix A** (gelber Verschluss)
5 µl verdünnte HS-Taq DNA Polymerase (1 U)
5 µl Ausgangs-DNA
 - B: **15 µl Amplification Mix B** (grüner Verschluss)
5 µl verdünnte HS-Taq DNA Polymerase (1 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/Master Mix mit 10 % Exzessvolumen vorbereiten, um Pipettierungsungenauigkeiten auszugleichen.

- Röhrchen fest verschließen. Thermocycler auf 94 °C vorheizen.
- Reaktionsröhrchen einsetzen und das folgende Thermocycling-Programm ausführen:
 - prä-PCR: 94 °C/3 Min.**
 - Thermocycling: 94 °C/15 Sek. – 60 °C/45 Sek. – 72 °C/1 Min. (35 Zyklen)**
 - Finale Extension: 72 °C/3 Min.**
- Amplifikationsprodukte auf Eis oder bei 2 °C bis 8 °C für die zukünftige Verwendung lagern.

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

Fragmentlängen: 472, 345, 315, 278, 257, 236/213, 194, 165 bp (A)
 386, 350, 322, 297, 248, 225, 200, 172, 155 bp (B)

3. Bearbeitung der Teststrips

3.1. Hybridisierung (manuell) – 2 Teststrips 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 alle bei 2 °C bis 8 °C gebildeten Präzipitate sich vollständig aufgelöst haben. Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B und Color Developer auf Raumtemperatur bringen. Typing Tray(s) vorbereiten.

Einen Teststrip A und einen Teststrip B 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.).

Für alle **Teststrips A** (eine Vertiefung pro Probe):

- **10 µl DNAT** (blauer Verschluss) in die untere Ecke jeder Vertiefung, die in den Typing Trays verwendet werden soll, pipettieren.
- **10 µl Amplifikationsprodukt A** in den entsprechenden Tropfen DNAT 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 Spur geben. Tray vorsichtig schütteln. (Die blaue Farbe verschwindet.)
- **Teststrip A** oder **Teststrip B** 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.

Für alle **Teststrips B** (eine Vertiefung pro Probe):

- **10 µl DNAT** (blauer Verschluss) in die untere Ecke jeder Vertiefung, die in den Typing Trays verwendet werden soll, pipettieren.
- **10 µl Amplifikationsprodukt B** in den entsprechenden Tropfen DNAT pipettieren.
- Mit einer Pipette gründlich mischen. (Die Lösung bleibt blau.)

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 Waschschriffe 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 von den entsprechenden Teststrips A und B mithilfe des beigefügten Collector™ Sheet bestimmt. Beide Teststrips in die gekennzeichneten Felder legen, mit der Schemazeichnung unter Verwendung der roten Markierungslinie (oben) und der grünen oder blauen 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:

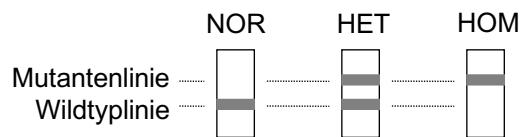


Abb. 2: Genotypen – Färbungsmuster auf Teststrip

	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 19 (Abb. 3).

Einige der von dem CF StripAssay® GER abgedeckten Punktmutationen befinden sich innerhalb weniger Nukleotide auf dem *CFTR*-Gen. Diese werden durch eine häufige Wildtypsonde auf den Teststreifen dargestellt:

Linie	Wildtypsonde	Mutation
20	codon 507 bis 508	I507del (-ATC), F508del (-CTT)
24	codon 551 bis 553	G551D, R553X
26	2183 bis 2184	2183AA>G, 2184delA, 2184insA
51	codon 334 bis 336	R334W, I336K

Bei Proben, die gemischt heterozygot für zwei dieser Mutationen sind (z. B. I507del + F508del oder G551D + R553X), fehlt in den meisten Fällen das jeweilige Wildtypsignal (siehe Beispiel G, Seite 19).

Neben ihrem Wildtypsignal fehlen homozygoten *CFTR*del2,3-Proben die Wildtypsignale für codon 60 und codon 85 (siehe Beispiel F, Seite 19).

Die benignen Varianten I506V, I507V und F508C verursachen keine Assay-Störung und erscheinen im CF StripAssay® GER als *CFTR*-Wildtyp.

Wie bei jedem diagnostischen Test müssen die Ergebnisse des CF StripAssay® GER im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Phänotyp des Patienten und anderen medizinischen Untersuchungen interpretiert werden, die dem Arzt zur Verfügung stehen. Der CF StripAssay® GER ist nicht indiziert für eigenständige Tests bei der CF-Diagnostik. ViennaLab Diagnostics GmbH übernimmt keine Verantwortung für getroffene klinische Entscheidungen.

VIII. LEISTUNGSBEWERTUNG

Die **Genauigkeit** des CF StripAssay® GER wurde durch Analysieren vortypisierter humaner genomischer DNA-Proben und synthetischer DNA-Kontrollproben bestimmt. Die Ergebnisse aller Proben entsprachen vollständig den verwendeten Referenzmethoden ((CF-EU2 Kit (Elucigene), LINEAR ARRAY CF Gold oder Amplicor® Cystic Fibrosis Kit (beide Roche), Sanger-Sequenzierung, HRM-Analyse, DGGE oder RFLP)). Der CF StripAssay® GER identifizierte 303 mutierte Allele (= 100 % positive prozentuale Übereinstimmung) und 155 Wildtyp-Allele (= 100 % negative prozentuale Übereinstimmung) in insgesamt 458 getesteten *CFTR*-Allelen korrekt.

Die **Präzision** der stark verbundenen CF StripAssays® wurde als Variabilität zwischen Probenotypen, Anwendern, Tagen, unterschiedlichen Chargen von Amplification Mixes, Thermocyclern und Hybridisierungsgeräten beurteilt. Diese Parameter wurden unter Verwendung des CF StripAssay® (REF 4-410) in insgesamt 58 Läufen untersucht, von denen alle 58 das erwartete Genotypisierungsergebnis zeigten. Es waren lediglich vernachlässigbare Unterschiede in den Färbungsintensitäten der Teststrips sichtbar und es wurde keine Hintergrundfärbung beobachtet. Die CF StripAssays® wurden am AB GeneAmp® PCR System 2700, AB GeneAmp® PCR System 9700, MJ Research PTC-200, AB Veriti™ 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 stark verbundenen CF StripAssays® umfasste Daten aus einer unveröffentlichten multizentrischen Vergleichsstudie sowie veröffentlichte Daten zur Verwendung von CF StripAssays® in einer klinischen Umgebung oder als Referenzmethode.

In der Vergleichsstudie wurden 155 Patientenproben aus dem Einzugsbereich von vier CF-Zentren in ganz Europa parallel mit dem CF StripAssay® (REF 4-410) und den routinemäßig in den teilnehmenden Labors verwendeten Referenzmethoden getestet. Der CF StripAssay® benannte 209 von 236 mutierten Allelen (diagnostische Sensitivität 88,6 %) und 74 von 74 Wildtyp-Allelen (diagnostische Sensitivität 100 %) korrekt. Die Literatursuche ergab 9 Publikationen in Verbindung mit der Sicherheit und Leistung der CF StripAssays®. In diesen Studien wurden keine unerwünschten Vorkommnisse oder Abweichungen im Vergleich zu anderen Geräten oder klinischen Symptomen identifiziert, was die klinische Leistung, die Vorteile und die Sicherheit der CF StripAssays® demonstrierte.

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 <math><10 \mu\text{M}</math> Hämoglobin, $0,1 \mu\text{M}$ Immunglobulin G, <math><1 \text{ \%}</math> peripherem Blut, $1,25 \text{ \%}$ Ethanol oder $0,1 \text{ mM}$ EDTA in der Reaktion störte die Leistung des StripAssay® nicht.

X. GRENZEN DES ASSAYS

Der CF StripAssay® ist ausschließlich für die Diagnose der 31 in Abschnitt III aufgelisteten bekannten Mutationen vorgesehen, die durch allelspezifische Sonden auf den Teststrips repräsentiert werden. Andere Punktmutationen oder große Deletionen im *CFTR*-Gen, die in der Probe eines Patienten vorhanden sein können, können nicht detektiert werden. Allenfalls kann eine unbeachtete Punktmutation, die sich innerhalb einer von einer Fangsonde überspannten Sequenz befindet, durch den Verlust des Wildtypsignals auf dem Teststrip angezeigt werden, wenn sie im homozygoten Zustand vorhanden ist.

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

In Fällen, in denen eine größere *CFTR*-Deletion auf dem zweiten Allel vorhanden ist, wird eine hemizygot Mutation fälschlicherweise als homozygot berichtet. Der klinische Phänotyp von CF ist jedoch sowohl mit dem hemi- als auch homozygoten Mutationsstatus assoziiert und daher führen solche Situationen letztendlich zur selben Diagnose.

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

Der CF StripAssay® GER 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 $2 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $8 \text{ }^\circ\text{C}$ 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)
- Cystic Fibrosis Foundation (www.cff.org)
- Cystic Fibrosis Mutation Database (www.genet.sickkids.on.ca)
- CF Network (<http://cf.eqascheme.org>)

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



In-vitro-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 DER TESTERGEBNISSE

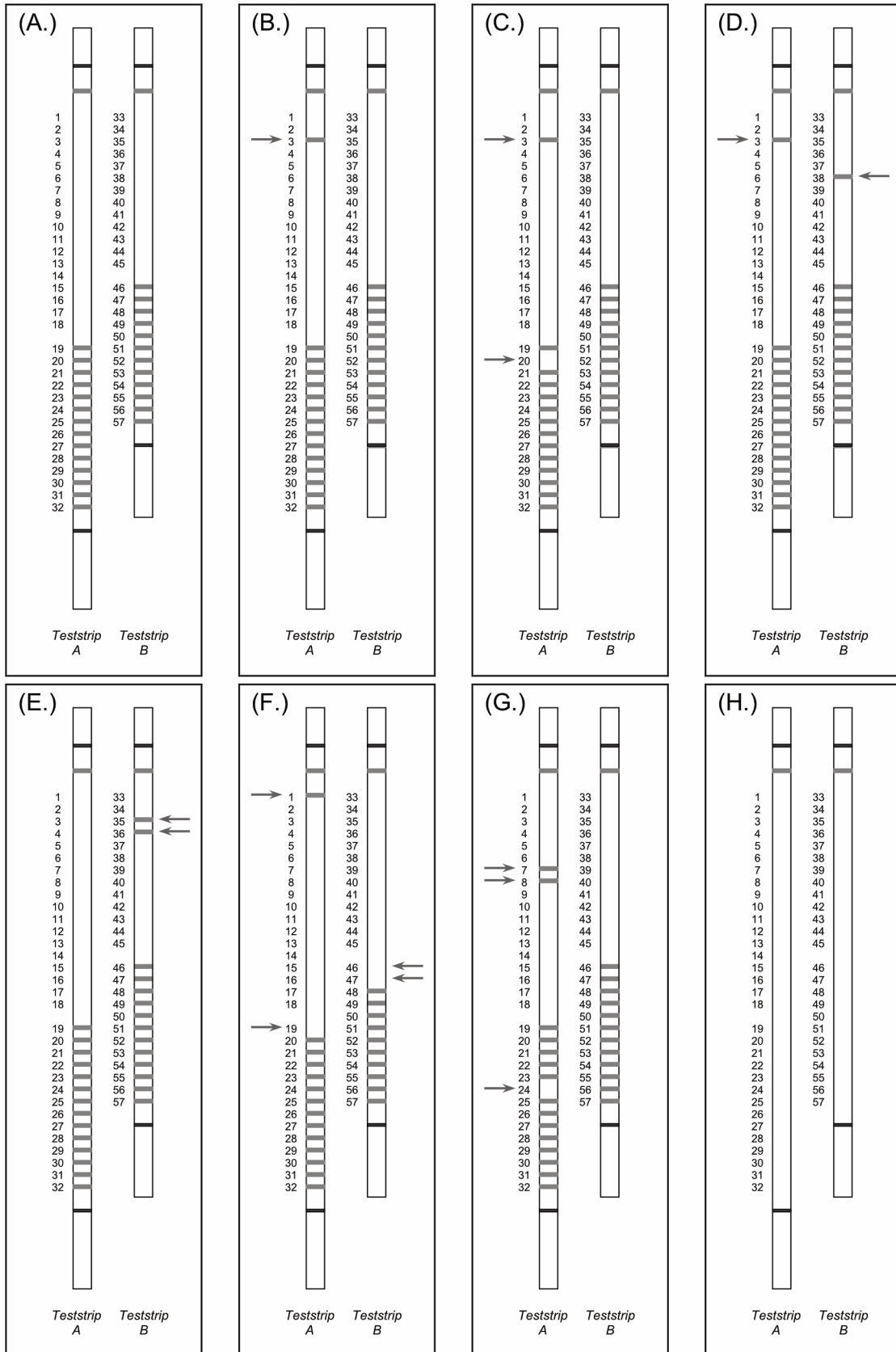


Abb. 3: Beispiele der mit dem CF StripAssay® GER erhaltenen Ergebnisse

(A.) normal

(B.) F508del heterozygot

(C.) F508del homozygot

(D.) F508del / R334W heterozygot


(E.) E92X / 621+1G>T heterozygot

(F.) CFTRdel2,3 (21kb) homozygot

(G.) G551D / R553X heterozygot

(H.) negative Kontrolle oder PCR-Versagen

XVIII. VERWANDTE PRODUKTE

REF		
4-410	CF StripAssay®	10 Tests
4-420	CF StripAssay® TUR	10 Tests
4-430	CF StripAssay® GER	10 Tests
4-440	CF StripAssay® EXT	10 Tests
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