

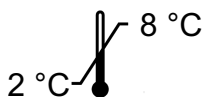
FMF StripAssay[®]

Gebrauchsanweisung

REF



4-230	20 Tests
4-230-A	48 Tests
4-230-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

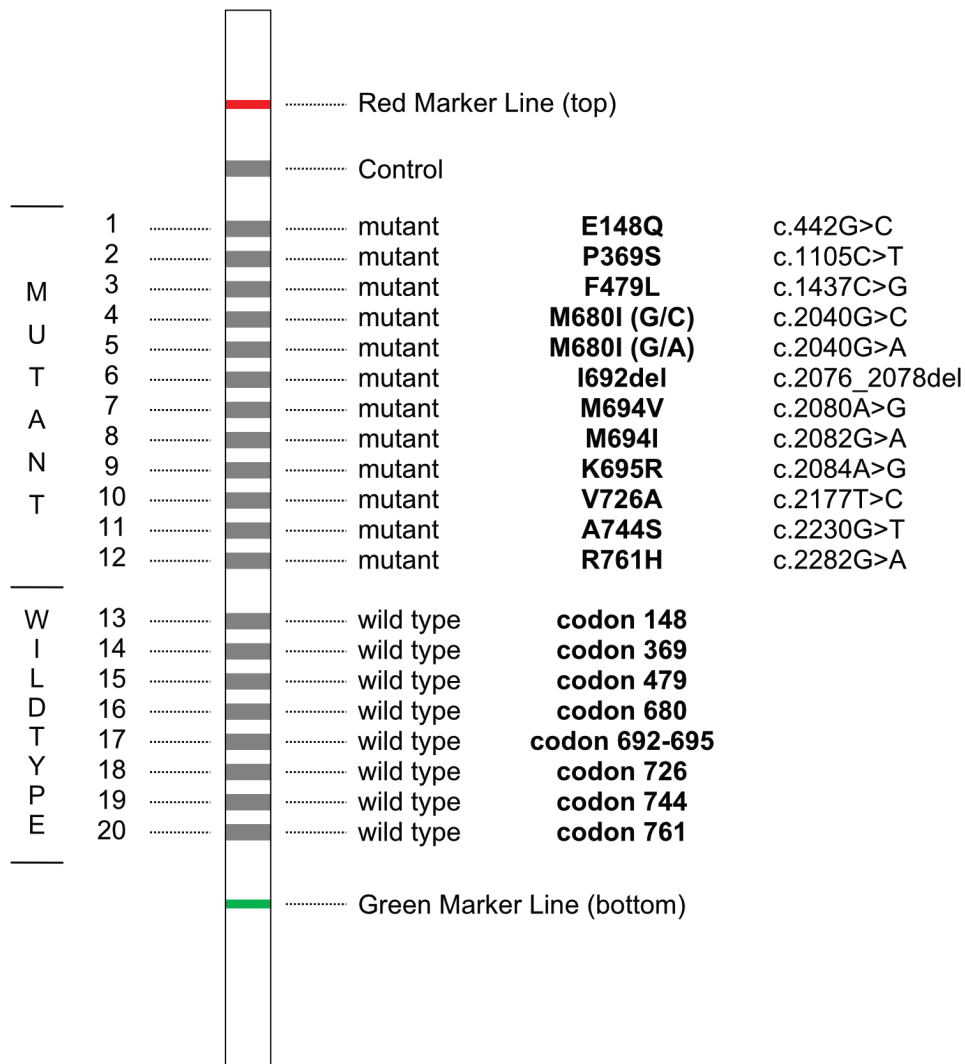
INHALTSVERZEICHNIS

ZWECKBESTIMMUNG	4
I. HINTERGRUND	4
II. METHODEN	4
III. KIT-BESTANDTEILE	6
IV. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN	7
V. DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS	8
VI. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	12
VII. LEISTUNGSBEWERTUNG	14
VIII. STÖRSUBSTANZEN	14
IX. GRENZEN DES ASSAYS	15
X. QUALITÄTSÜBERLEGUNGEN	15
XI. SICHERHEIT	15
XII. TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG	16
XIII. REFERENZEN	16
XIV. RÜCKMELDUNG AN DEN HERSTELLER	16
XV. SYMBOLE	17
XVI. BEISPIELE DER TESTERGEBNISSE	18
XVII. VERWANDTE PRODUKTE	20

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!

ZWECKBESTIMMUNG

Der FMF StripAssay® ist ein qualitativer genetischer Test für die zielgerichtete Analyse von 12 häufigen Mutationen im Gen *MEFV*, die das familiäre Mittelmeerfieber (FMF, Familial Mediterranean Fever) verursachen. Für die Tests wird genomische DNA, die aus peripheren Vollblutproben extrahiert wurde, verwendet. Der FMF StripAssay® soll als Hilfe bei der Diagnose von FMF bei Patienten dienen, die mit einem klinischen Symptommuster erscheinen, das FMF entspricht, oder bei gefährdeten Verwandten eines Patienten mit einer pathogenen *MEFV*-Mutation. Der StripAssay® kann entweder manuell oder halbautomatisch durchgeführt werden.

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

I. HINTERGRUND

Familiäres Mittelmeerfieber ist die häufigste monogene autoinflammatorische Erkrankung, die durch wiederkehrende fiebrige Episoden, begleitet von Schmerzen im Abdomen (Peritonitis), in der Brust (Pleuritis) oder in den Gelenken (Arthritis) und wundroseähnliche Hautrötung gekennzeichnet ist. Systemische Reaktive (AA) Amyloidose ist als Langzeitkomplikation bei schwerer Erscheinungsform und schlechter Prognose bekannt. FMF hat in der Mehrzahl der Fälle ein autosomal-rezessives Vererbungsmuster und wird hauptsächlich bei Patienten im Mittelmeerraum und Nahen Osten beobachtet. Zahlreiche Varianten innerhalb des Mittelmeerfieber-(*MEFV*-)Gens wurden als molekulare Defekte beschrieben, die FMF verursachen. Das *MEFV*-Gen selbst befindet sich auf Chromosom 16p13.3 und umfasst 10 Exone, die ein als Pyrin bezeichnetes 781-Aminosäureprotein codieren. Die klinische Repräsentation von FMF kann komplex sein, daher sind Gentests auf *MEFV*-Mutationen ein gangbarer Weg zur Bestätigung der Diagnose.

II. METHODEN

Der FMF 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 FMF StripAssay® detektiert die folgenden Mutationen im *MEFV*-Genlocus:

	Alter Name	HGVS-Nomenklatur		RefSNP
1	E148Q	c.442G>C	g.7002G>C	rs3743930
2	P369S	c.1105C>T	g.12042C>T	rs11466023
3	F479L	c.1437C>G	g.14462C>G	rs104895083
4	M680I (G/C)	c.2040G>C	g.18181G>C	rs28940580
5	M680I (G/A)	c.2040G>A	g.18181G>A	rs28940580
6	I692del	c.2076_2078del	g.18217_18219delAAT	rs104895093
7	M694V	c.2080A>G	g.18221A>G	rs61752717
8	M694I	c.2082G>A	g.18223G>A	rs28940578
9	K695R	c.2084A>G	g.18225A>G	rs104895094
10	V726A	c.2177T>C	g.18318T>C	rs28940579
11	A744S	c.2230G>T	g.18371G>T	rs61732874
12	R761H	c.2282G>A	g.18423G>A	rs104895097

Referenzsequenz (RefSeq, Reference Sequence):



NM_000243.2

NG_007871.1

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

III. KIT-BESTANDTEILE

REF

	4-230	4-230-A	4-230 -TRIAL
1. Lysis Solution	50 ml	---	50 ml
2. GENXTRACT™ Resin	5 ml	---	5 ml
3. Amplification Mix (gelber Verschluss)	500 µl	2 x 500 µl	500 µl
4. Taq Dilution Buffer (transparenter Verschluss)	500 µl	500 µl	500 µl
5. Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (roter Verschluss)	75 U	125 U	75 U
6. DNAT (blauer Verschluss)	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	---	1
8. Teststrips	20	2 x 24	5
9. Hybridization Buffer (weißer Verschluss)	25 ml	65 ml	25 ml
10. Wash Solution A (weißer Verschluss)	80 ml	200 ml	80 ml
11. Conjugate Solution (transparenter Verschluss)	25 ml	65 ml	25 ml
12. Wash Solution B (transparenter Verschluss)	80 ml	200 ml	80 ml
13. Color Developer (brauner Verschluss)	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	Sequenzspezifische 5'-biotinmarkierte Oligonukleotide, eine äquimolare Mischung aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), Ammoniumsulfatpuffer, Glycerol, 0,05 % Natriumazid
Taq Dilution Buffer	Puffer für Taq DNA Polymerase, mit (NH ₄) ₂ SO ₄ und MgCl ₂ , 0,05 % Natriumazid
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	Taq DNA Polymerase mit einer Konzentration von 5 U/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

Name der Komponente	Zusammensetzung
Teststrips	Allelspezifische Oligonukleotidsonden und eine Hybridisierungskontrolle, immobilisiert als Anordnung paralleler Linien auf einer polyestergestützten Membran, begrenzt durch eine rote Linie oben und eine grüne 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

IV. 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 VII)
- 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)

V. DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS

1. Probenvorbereitung

Probe: Frisches oder gefrorenes Blut mit EDTA-Antikoagulans verwenden. Blut, das Heparin oder Citrat enthält, wurde nicht getestet. Blut vor der 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.

DNA-Extraktion: 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) eingefroren werden.

Der Einsatz anderer Methoden zur DNA-Isolierung mit dem FMF 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.

2. In-vitro-Amplifikation (PCR)

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

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

- Ein Reaktionsröhrchen für jede zu amplifizierende Probe vorbereiten. Die Röhrchen auf Eis legen.
- Für jede Probe eine endgültige PCR-Reaktionsmischung auf Eis vorbereiten:
 - 15 µl Amplification Mix** (gelber Verschluss)
 - 5 µl verdünnte Taq DNA Polymerase** (1 U)
 - 5 µl Ausgangs-DNA**

Hinweis: Es wird empfohlen, einen Master Mix für alle Proben vorzubereiten, der Amplification Mix und verdünnte 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/2 Min.**
 - Thermocycling: 94 °C/15 Sek. – 58 °C/30 Sek. – 72 °C/30 Sek. (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: 206, 236, 295, 318 bp

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 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 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.).

- **10 µl DNAT** (blauer Verschluss) in die untere Ecke jeder Vertiefung, die in den Typing Trays verwendet werden soll, pipettieren (eine Vertiefung pro Probe).
- **10 µl Amplifikationsprodukt** 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 Vertiefung geben. Tray vorsichtig schütteln. (Die blaue Farbe verschwindet.)
- **Teststrip** 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 stringentenWaschschritte 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.

VI. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Der Genotyp der Probe wird mithilfe des beigefügten Collector™ Sheet bestimmt. Teststrip in eines der gekennzeichneten Felder legen, mit der Schemazeichnung 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:

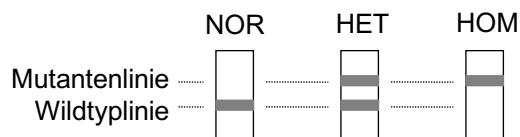


Abb. 2: Genotypen – Färbungsmuster auf Teststrip

	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 18 (Abb. 3).

Einige der vom FMF StripAssay® abgedeckten Mutationen befinden sich innerhalb weniger Nukleotide auf dem *MEFV*-Gen. Diese werden auf den Teststrips durch eine häufige Wildtypsonde dargestellt, sodass die 12 Mutationen durch nur 8 Wildtypsonden abgedeckt werden:

Linie	Wildtypsonde	Mutation
13	codon 148	E148Q
14	codon 369	P369S
15	codon 479	F479L
16	codon 680	M680I (G/C), M680I (G/A)
17	codon 692-695	I692del, M694V, M694I, K695R
18	codon 726	V726A
19	codon 744	A744S
20	codon 761	R761H

Bei Proben, die gemischt heterozygot für zwei dieser Mutationen sind (z. B. M694V + M694I, M694V + K695R), fehlt in den meisten Fällen das jeweilige Wildtypsignal (siehe Beispiele I und J, Seite 18).

Wie bei jedem diagnostischen Test müssen die Ergebnisse des FMF 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.

VII. LEISTUNGSBEWERTUNG

Die **Genauigkeit** des FMF StripAssay® wurde durch Analyse von 173 vortypisierten genomischen DNA-Proben bestimmt. Die Ergebnisse entsprachen vollständig der Referenzmethode (Sanger-Sequenzierung, denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis) und Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP, restriction fragment length polymorphism)). Der Assay detektierte 251 mutierte Allele (= 100 % positive prozentuale Übereinstimmung) und 103 Wildtyp-Allele (= 100 % negative prozentuale Übereinstimmung) korrekt.

Die **Präzision** des FMF StripAssay® wurde als Variabilität zwischen Replikaten, Anwendern, Tagen, Reagenzchargen, Thermocyclern und Hybridisierungsgeräten (manuelle und halbautomatische Hybridisierung) beurteilt. Bei insgesamt 106 Testreplikaten, 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 FMF StripAssay® wurde am AB GeneAmp® PCR System 2700, AB GeneAmp® PCR System 9700, AB Veriti und MJ Research PTC-200 validiert, die eine Heiz- und Kühlrate im Bereich von 1,7 bis 4,2 °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 veröffentlichte 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 FMF StripAssay® zur Unterstützung des klinischen Nachweises umfasste eine systematische Prüfung der verfügbaren Daten und anwendbaren Elemente. Als Ergebnis der Literatursuche wurden 22 Publikationen identifiziert, die sich mit der Sicherheit und Leistung des FMF StripAssay® befassen und den klinischen Nutzen des FMF StripAssay® belegen. In Methodenvergleichsstudien wurden keine unerwünschten Vorkommnisse oder Abweichungen identifiziert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die klinische Leistung, der Nutzen und die Sicherheit des FMF StripAssay® bestätigt werden, wenn der Assay wie vorgesehen zur Diagnose von familiärem Mittelmeerfieber verwendet wird.

VIII. 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 störte die Leistung des StripAssay® nicht.

IX. GRENZEN DES ASSAYS

Der FMF StripAssay® ist ausschließlich für die Detektion der 12 in Abschnitt II aufgelisteten bekannten Mutationen vorgesehen, die durch allelspezifische Sonden auf den Teststrips repräsentiert werden. Andere *MEFV*-Mutationen, die in der Probe eines Patienten vorhanden sein können, können nicht detektiert werden.

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

DNA-Proben, die durch andere Methoden als die mit dem FMF StripAssay® mitgelieferten Reagenzien und Protokolle gewonnen wurden, können in manchen Fällen schwache oder fehlende Signale für den Wildtyp und die Mutation E148Q zeigen. Der Effekt beruht auf der Beeinträchtigung der PCR-Effizienz für dieses bestimmte Fragment und wurde bei mehreren verbreiteten DNA-Extraktionskits beobachtet. Eine 10-minütige Vorerwärmung solcher DNA-Proben auf 98 °C, unmittelbar gefolgt vom Abkühlen auf Eis oder in einem Kälteblock vor Einrichtung der PCR, kann normale PCR-Erträge komplett wiederherstellen.

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

X. 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.

XI. 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.

XII. 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












XIII. REFERENZEN

- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man (www.omim.org)
- Infevers-Datenbank (<https://infevers.umai-montpellier.fr/web>)
- ISSAID (www.issaid.org)

XIV. 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.

XV. SYMBOLE

	Katalognummer
	Chargencode
	<i>In-vitro</i> -Diagnostika
	Entspricht der europäischen IVD-Bestimmung 2017/746
0123	Identifikationsnummer der benannten Stelle
	Ausreichend für <n> Tests
	Temperaturgrenzwerte für die Lagerung
	Zu verwenden bis
	Vorsicht
	Hersteller
	Herstellungsdatum
	Siehe Gebrauchsanweisung

XVI. BEISPIELE DER TESTERGEBNISSE

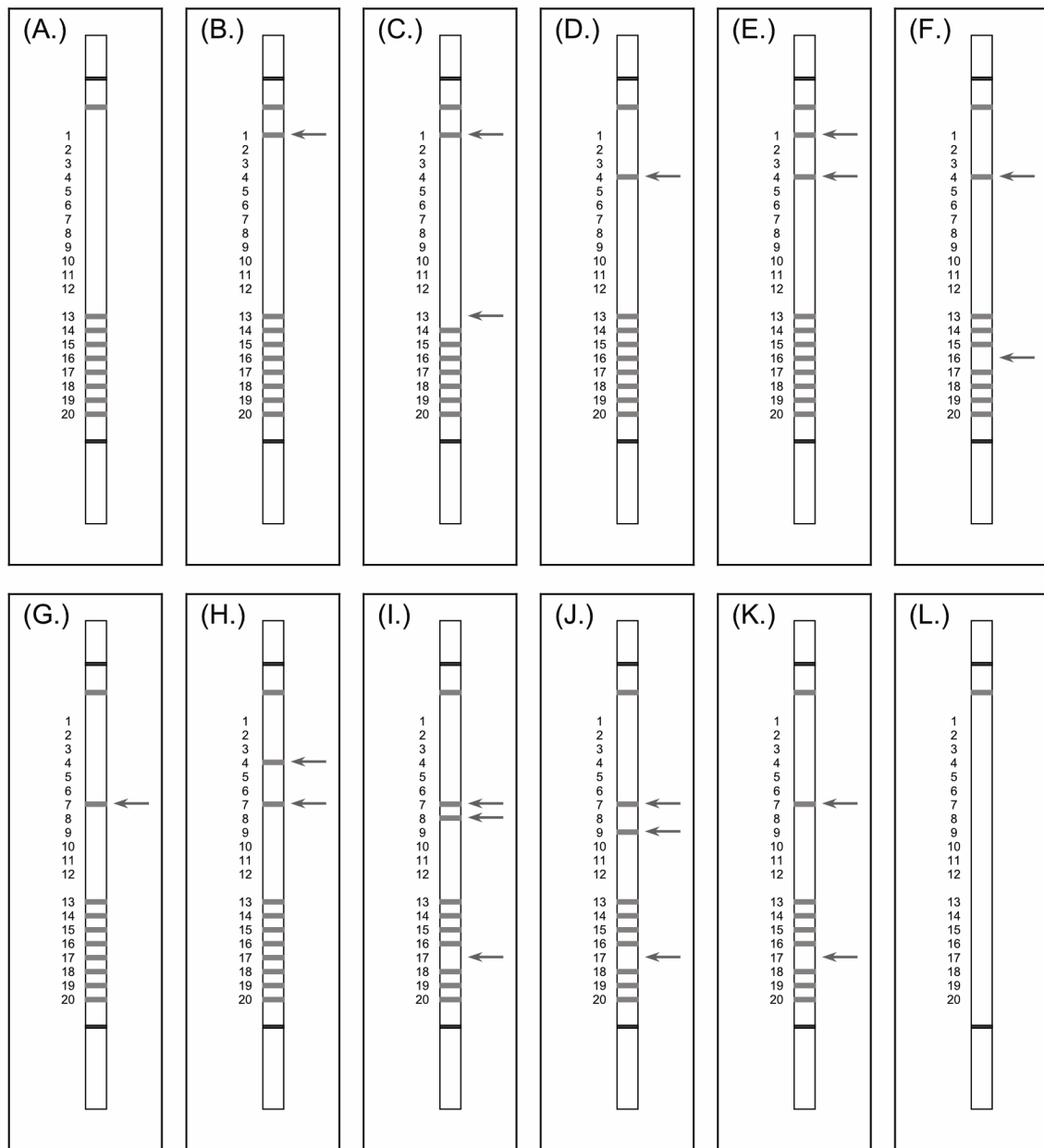



Abb. 3: Beispiele der mit dem FMF StripAssay® erhaltenen Ergebnissen

- | | |
|--------------------------------------|---|
| (A.) normal | (G.) M694V heterozygot |
| (B.) E148Q heterozygot | (H.) M680I (G/C) - M694V heterozygot |
| (C.) E148Q homozygot | (I.) M694V - M694I heterozygot |
| (D.) M680I (G/C) heterozygot | (J.) M694V - K695R heterozygot |
| (E.) E148Q - M680I (G/C) heterozygot | (K.) M694V homozygot |
| (F.) M680I (G/C) homozygot | (L.) negative Kontrolle oder PCR-Versagen |

HINWEISE

XVII. VERWANDTE PRODUKTE

REF		
4-230	FMF StripAssay®	20 Tests
4-390	FMF-SAA1 StripAssay®	20 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®**

ViennaLab Diagnostics GmbH

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

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com