

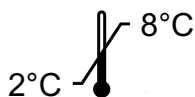
FMF StripAssay[®]

Οδηγίες χρήσης

REF



4-230	20 δοκιμές
4-230-A	48 δοκιμές
4-230-TRIAL	5 δοκιμές



Έκδοση: αναθ. 1.0 / Ελληνικά
Οι ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης (eIFU) και
άλλες γλώσσες είναι διαθέσιμες στη διεύθυνση
www.viennalab.com

IVD

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

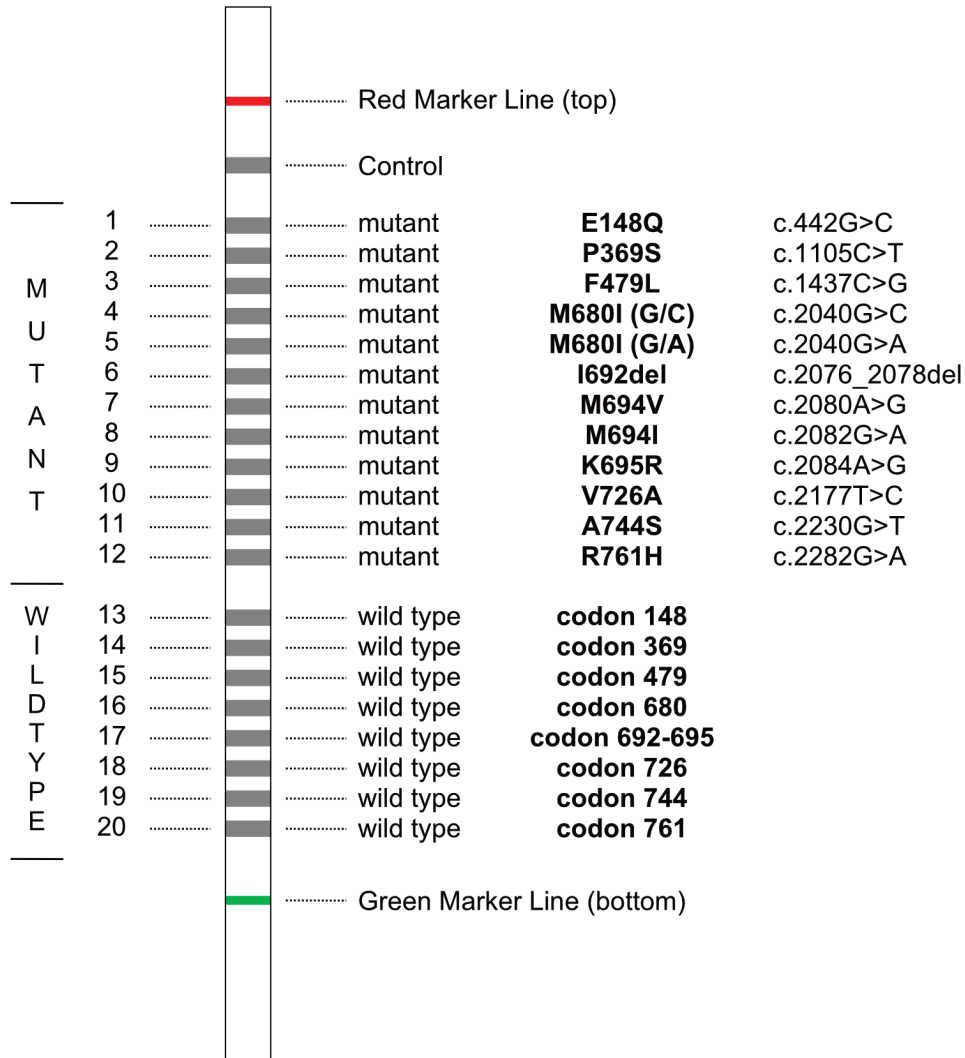
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I.	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ	4
II.	ΙΣΤΟΡΙΚΟ.....	4
III.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	4
IV.	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΙΤ	6
V.	ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ	7
VI.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	8
VII.	ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	12
VIII.	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	14
IX.	ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	14
X.	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	15
XI.	ΘΕΜΑΤΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	15
XII.	ΑΣΦΑΛΕΙΑ	15
XIII.	ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ.....	16
XIV.	ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	16
XV.	ΣΧΟΛΙΑ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ	16
XVI.	ΣΥΜΒΟΛΑ.....	17
XVII.	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ	18
XVIII.	ΣΧΕΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	20

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΕΩΝ:

έκδοση	ημερομηνία	περιγραφή
αναθ. 1.0	2022-11	Προσθήκη περιεχομένου που σχετίζεται με το IVDR στην έκδοση 2022-01.

Η περίληψη της ασφάλειας και των επιδόσεων (SSP, Summary of Safety and Performance) για το StripAssay® μπορεί να ανακτηθεί από την ευρωπαϊκή βάση δεδομένων για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα (EUDAMED), <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> ή από τον κατασκευαστή.



EN	EL
mutant	μεταλλαγμένος
wildtype	άγριου τύπου
control	μάρτυρας
red marker line (top)	κόκκινη γραμμή δείκτη (επάνω)
green marker line (bottom)	πράσινη γραμμή δείκτη (κάτω)

Εικ. 1: Σχεδίαση Teststrip

Σημείωση: Τα Teststrips δεν σχεδιάζονται σε πραγματικό μέγεθος και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων!

I. ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το FMF StripAssay® είναι μια ποιοτική, γενετική δοκιμή για τη στοχευμένη ανάλυση 12 συχνών μεταλλάξεων στο γονίδιο *MEFV* που σχετίζονται με τον Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό (FMF, Familial Mediterranean Fever). Για τον έλεγχο χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA που εξάγεται από δείγματα ολικού περιφερικού αίματος. Το FMF StripAssay® έχει σχεδιαστεί για να χρησιμεύει ως βοήθημα για τη διάγνωση του Οικογενούς Μεσογειακού Πυρετού σε ασθενείς που παρουσιάζουν ένα μοτίβο κλινικών συμπτωμάτων σύμφωνο με τον Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό ή σε συγγενείς ενός ασθενούς που βρίσκονται σε κίνδυνο, με αναγνωρισμένη παθογόνο μετάλλαξη *MEFV*. Το StripAssay® μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χειροκίνητα είτε ημιαυτόματα. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση σε ανθρώπους.

II. ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Ο Οικογενής Μεσογειακός Πυρετός είναι η πιο κοινή μονογενής αυτοφλεγμονώδης διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα εμπύρετα επεισόδια, που συνοδεύονται από πόνο στην κοιλιακή χώρα (περιτονίτιδα), στον θώρακα (πλευρίτιδα) ή στις αρθρώσεις (αρθρίτιδα) και ερύθημα του δέρματος που μοιάζει με ερυσίπελας. Είναι γνωστό ότι η συστηματική αντιδραστική (AA) αμυλοείδωση είναι η κύρια μακροχρόνια επιπλοκή με σοβαρή εκδήλωση και κακή πρόγνωση. Ο Οικογενής Μεσογειακός Πυρετός έχει αυτοσωματικό υπολειπόμενο μοτίβο κληρονομικότητας στην πλειονότητα των περιπτώσεων και παρατηρείται κυρίως σε ασθενείς από πληθυσμούς της Μεσογείου ή της Μέσης Ανατολής. Πολλές παραλλαγές του γονιδίου του μεσογειακού πυρετού (*MEFV*) έχουν περιγραφεί ως τα μοριακά ελαττώματα που προκαλούν Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό. Το ίδιο το γονίδιο *MEFV* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16p13.3 και περιλαμβάνει 10 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 781 αμινοξέων γνωστή ως πυρίνη. Η κλινική αναπαράσταση του Οικογενούς Μεσογειακού Πυρετού μπορεί να είναι πολύπλοκη, επομένως ο γενετικός έλεγχος για μεταλλάξεις *MEFV* είναι ένας εφικτός τρόπος για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση.

III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Το FMF StripAssay® βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) και στον αντίστροφο υβριδισμό. Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια: (1) απομόνωση DNA, (2) ενίσχυση PCR με χρήση βιοτινυλιωμένων εκκινήτων, (3) υβριδισμό προϊόντων ενίσχυσης σε Teststrip που περιέχει ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές ειδικούς για αλληλόμορφα ακινητοποιημένους ως συστοιχία παράλληλων γραμμών (Εικ. 1). Οι δεσμευμένες βιοτινυλιωμένες αλληλουχίες ανιχνεύονται με χρήση στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης και χρωματικών υποστρωμάτων.

Το FMF StripAssay® ανιχνεύει τις ακόλουθες μεταλλάξεις στη θέση του γονιδίου *MEFV*:

	παλαιότερη ονομασία	ονοματολογία HGVS		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

Αλληλουχία αναφοράς (RefSeq, Reference Sequence):



NM_000243.2

NG_007871.1

Η δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί χειροκίνητα ή ημιαυτόματα με όργανα σχεδιασμένα για αυτοματοποίηση της επεξεργασίας του Teststrip (βλ. ενότητα VI. 3.4).

IV. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΙΤ

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 (κίτρινο πώμα)	500 µl	2 x 500 µl	500 µl
4. Taq Dilution Buffer (διαφανές πώμα)	500 µl	500 µl	500 µl
5. Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (κόκκινο πώμα)	75 U	125 U	75 U
6. DNAT (μπλε πώμα)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Προειδοποίηση: Το DNAT περιέχει 1,6% NaOH H315: Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος H319: Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό P280: Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο P337 + P313: Σε περίπτωση που επιμένει ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό</p>			
7. Typing Trays	3	---	1
8. Δοκιμαστικές ταινίες	20	2 x 24	5
9. Hybridization Buffer (λευκό πώμα)	25 ml	65 ml	25 ml
10. Wash Solution A (λευκό πώμα)	80 ml	200 ml	80 ml
11. Conjugate Solution (διαφανές πώμα)	25 ml	65 ml	25 ml
12. Wash Solution B (διαφανές πώμα)	80 ml	200 ml	80 ml
13. Color Developer (καφέ πώμα)	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Προειδοποίηση: Το Color Developer περιέχει ≤ 0,4% μηλεϊνικό οξύ H317: Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση P280: Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο P302 + P352: Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα: Πλύνετε με άφθονο νερό P333 + P313: Εάν εμφανιστεί ερεθισμός του δέρματος ή εξάνθημα: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό</p>			
14. Οδηγίες χρήσης	1	1	1
15. Collector™ Sheet	1	3	1

Σημείωση: Φυλάσσετε όλα τα αντιδραστήρια στους 2 °C έως 8 °C όταν δεν χρησιμοποιούνται!

όνομα της σύνθεσης	του συστατικού
Lysis Solution	υποτονικό διάλυμα που περιέχει KHCO ₃ , NH ₄ Cl, EDTA
GENXTRACT™ Resin	Chelex 100 Resin MB σε ρυθμιστικό διάλυμα
Amplification Mix	ειδικά για την αλληλουχία ολιγονουκλεοτίδια σημασμένα με 5'-βιοτίνη, ένα ισομοριακό μείγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP και dTTP), ρυθμιστικό διάλυμα θειικού αμμωνίου, γλυκερόλη, 0,05% αζίδιο νατρίου
Taq Dilution Buffer	ρυθμιστικό διάλυμα για το taq DNA polymerase, συμπεριλαμβανομένων των (NH ₄) ₂ SO ₄ και MgCl ₂ , 0,05% αζίδιο νατρίου
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	taq DNA polymerase σε συγκέντρωση των 5 U/µl

όνομα της σύνθεσης	του συστατικού
DNAT	βασικό διάλυμα που περιέχει 1,6% υδροξείδιο του νατρίου και μια μπλε χρωστική που υποδηλώνει μεταβολή του pH
Typing Trays	πλαστικός δίσκος με οκτώ βοθρία
Δοκιμαστικές ταινίες	ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτές ειδικοί για αλληλόμορφα και ένας έλεγχος υβριδισμού ακινητοποιημένος ως συστοιχία παράλληλων γραμμών σε μια μεμβράνη με πολυεστέρα που πλαισιώνεται από μια κόκκινη γραμμή στο επάνω μέρος και μια πράσινη γραμμή στο κάτω μέρος
Hybridization Buffer	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με < 2% απορρυπαντικό
Wash Solution A	ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού με < 1% απορρυπαντικό
Conjugate Solution	αλκαλική φωσφατάση συζευγμένη με στρεπταβιδίνη, αραιωμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα με βάση αλατούχο διάλυμα με 0,05% αζίδιο νατρίου
Wash Solution B	ρυθμιστικό διάλυμα tris που περιέχει < 2% απορρυπαντικό και 0,05% αζίδιο νατρίου
Color Developer	το χρωματικό υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση περιέχει κυανό του νιτροτετραζολίου (NBT, nitro blue tetrazolium) και 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-φωσφορικό (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
Οδηγίες χρήσης	εκτυπωμένο χαρτί
Collector™ Sheet	εκτυπωμένο χαρτί

V. ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Εκτός από τον τυπικό εργαστηριακό εξοπλισμό μοριακής βιολογίας, απαιτούνται τα ακόλουθα:

- Θερμομπλόκ ή θερμομείκτης για σωληνάρια αντίδρασης 1,5 ml με έλεγχο θερμοκρασίας έως 99 °C
- Ρυθμιζόμενη μικροφυγόκεντρος ικανή για 3.000-12.000 rpm (1.000-12.000 x g)
- Θερμοκυκλοποιητής με θερμαινόμενο καπάκι (για προδιαγραφές ρυθμών μεταβολής, βλ. ενότητα VIII)
- Υδατόλουτρο με πλατφόρμα ανακίνησης, καπάκι και ρυθμιζόμενη θερμοκρασία (45 °C ± 1 °C)
- Ανακινητήρας (πιεζόμενος ή τροχιακός ανακινητήρας)

Προαιρετικά:

- Συσσκευή αναρρόφησης κενού
- Θερμικός ανακινητήρας για μορφή ογκομετρικής πλάκας με καπάκι και ρυθμιζόμενη θερμοκρασία (45 °C ± 1 °C), π.χ. PST-60 HL (Biosan) ή ισοδύναμη συσκευή
- Όργανο για αυτοματοποιημένο υβριδισμό, ρυθμιζόμενο στο προφίλ χρόνου-θερμοκρασίας όπως περιγράφεται στην ενότητα VI. 3.4, π.χ. DYNABLOT Heat (Dynex) ή ισοδύναμη συσκευή
- Εξοπλισμός ηλεκτροφόρησης γέλης αγαρόζης (για έλεγχο προϊόντων ενίσχυσης)

VI. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ**1. Προετοιμασία δειγμάτων**

Δείγμα: Χρησιμοποιήστε φρέσκο ή κατεψυγμένο αίμα με αντιπηκτικό EDTA. Δεν έχει πραγματοποιηθεί έλεγχος σε αίμα που περιέχει ηπαρίνη ή κιτρικό. Μην αποθηκεύετε το αίμα για περισσότερο από 3 ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή περισσότερο από 1 εβδομάδα στους 2 °C έως 8 °C πριν από τη χρήση. Το αίμα που έχει διατηρηθεί κατεψυγμένο για περισσότερο από ένα έτος ή έχει υποστεί περισσότερους από τρεις κύκλους ψύξης-απόψυξης δεν πρέπει να χρησιμοποιείται. Για τη συλλογή και τη μεταφορά δειγμάτων ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης του σωληναρίου συλλογής αίματος με EDTA και τις γενικές συστάσεις για αιμοληψία.

Εκχύλιση DNA: Αφήστε τα δείγματα αίματος να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Αναμείξτε καλά αναστρέφοντας προσεκτικά τα σωληνάκια συλλογής αίματος αρκετές φορές. Αφήστε το Lysis Solution και το GENXTRACT™ Resin να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.

- Μεταφέρετε με πιπέτα **100 μl δείγματος αίματος** σε μικροσωληνάριο με βιδωτό καπάκι 1,5 ml.
- Προσθέστε **1 ml Lysis Solution**, κλείστε το σωληνάριο και αναμείξτε αναστρέφοντας πολλές φορές.
- Αφήστε να σταθεί για **15 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρίστε για **5 λεπτά** σε **3.000 rpm** (περίπου 1.000 x g) σε μικροφυγόκεντρο.
- Αφαιρέστε και απορρίψτε το επάνω (κορυφή) 1 ml υπερκείμενου.
- Προσθέστε **1 ml Lysis Solution**, κλείστε το σωληνάριο και αναμείξτε αναστρέφοντας πολλές φορές.
- Φυγοκεντρίστε για **5 λεπτά** σε **12.000 rpm** (περίπου 12.000 x g) σε μικροφυγόκεντρο.
- Αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο εκτός από περίπου 50 μl ενός ορατού, μαλακού ιζήματος.
- Ενωρήστε ξανά το GENXTRACT™ Resin περιστρέφοντας καλά τη φιάλη.
- Προσθέστε **200 μl GENXTRACT™ Resin** στο ίζημα. Κλείστε το σωληνάριο και αναδεύστε για 10 δευτερόλεπτα.

Σημείωση: Τα ιζήματα του GENXTRACT™ Resin σχηματίζονται γρήγορα. Επαναλάβετε την επαναιώρηση κάθε φορά, αμέσως πριν αφαιρέσετε ένα άλλο δείγμα.

- Επωάστε για **20 λεπτά** στους **56 °C**. Αναδεύστε για 10 δευτερόλεπτα.
- Επωάστε για **10 λεπτά** στους **98 °C**. Αναδεύστε για 10 δευτερόλεπτα.
- Φυγοκεντρίστε για **5 λεπτά** σε **12.000 rpm** σε μικροφυγόκεντρο. Ψύξτε στον πάγο.

Το προκύπτον υπερκείμενο περιέχει πρότυπο DNA κατάλληλο για άμεση χρήση στην PCR. Για περαιτέρω αποθήκευση, το υπερκείμενο θα πρέπει να μεταφερθεί σε φρέσκο σωληνάριο και να διατηρηθεί στο ψυγείο (2 °C έως 8 °C, έως μία εβδομάδα) ή στην κατάψυξη στους -30 °C έως -15 °C (για μεγάλο χρονικό διάστημα).

Δεν έχει επικυρωθεί η χρήση άλλων μεθόδων απομόνωσης DNA με το FMF StripAssay® Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται άλλα συστήματα εκχύλισης DNA, η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA θα πρέπει να είναι εντός του εύρους 2 έως 10 ng/μl και σε αναλογία OD_{A260/280} 1,7 έως 2,0, αντιστοίχως. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις DNA πρέπει να αραιωθούν στο συνιστώμενο εύρος πριν από την εισαγωγή PCR.

2. Ενίσχυση in vitro (PCR)

Σημαντικό: Διατηρείτε στο ψυγείο όλα τα αντιδραστήρια PCR και τα πρότυπα DNA.

- Κάθε φορά, προετοιμάζετε μια κατάλληλη, φρέσκια ποσότητα διαλύματος εργασίας (1:25, τελική συγκ. 0,2 U/μl) **Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, κόκκινο πώμα) σε **Taq Dilution Buffer** (διαφανές πώμα) για τον αριθμό των δειγμάτων που θα αναλυθούν, συν τον **μάρτυρα χωρίς πρότυπο** (NTC, no-template control).

συστατικό	ανά αντίδραση	π.χ. 10 αντιδράσεις
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,2 μl	2 μl
Taq Dilution Buffer	4,8 μl	48 μl
διάλυμα εργασίας	5 μl	50 μl

- Προετοιμάστε ένα σωληνάριο αντίδρασης για κάθε δείγμα προς ενίσχυση. Τοποθετήστε τα σωληνάρια σε πάγο.
- Για κάθε δείγμα, προετοιμάστε ένα τελικό μείγμα αντίδρασης PCR σε πάγο:
15 μl Amplification Mix (κίτρινο πώμα)
5 μl αραιωμένο Taq DNA Polymerase (1 U)
5 μl Πρότυπο DNA

Σημείωση: Συνιστάται η προετοιμασία ενός κύριου μείγματος για όλα τα δείγματα που περιέχουν Amplification Mix και αραιωμένο Taq DNA Polymerase. Πρώτα μεταφέρετε με πιπέτα 20 μl του κύριου μείγματος σε κάθε σωληνάριο PCR και, στη συνέχεια, προσθέστε το πρότυπο DNA. Συμπεριλάβετε έναν NTC σε κάθε ανάλυση χρησιμοποιώντας νερό ποιότητας PCR αντί για DNA (ή κατά προτίμηση τον αρνητικό μάρτυρα της εκχύλισης DNA).

Γενικά, προετοιμάστε διαλύματα εργασίας/κύριο μείγμα με 10% περίσσεια όγκου για να αντισταθμίσετε τις ανακρίβειες της μεταφοράς με πιπέτα.

- Καλύψτε καλά τα σωληνάρια. Προθερμάνετε τον θερμοκυκλοποιητή στους 94°C.
- Τοποθετήστε τα σωληνάρια αντίδρασης και εκτελέστε το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης:
προ-PCR: 94°C/2 λεπτά.
θερμοκυκλοποίηση: 94 °C/15 δευτ. - 58 °C/30 δευτ. - 72 °C/30 δευτ. (35 κύκλοι)
τελική επέκταση: 72 °C/3 λεπτά.
- Αποθηκεύστε τα προϊόντα ενίσχυσης σε πάγο ή στους 2 °C έως 8 °C για περαιτέρω χρήση.

Προαιρετικά: Αναλύστε τα προϊόντα ενίσχυσης με ηλεκτροφόρηση γέλης (π.χ. γέλη αгарόζης 3%).

Μήκη θραυσμάτων: 206, 236, 295, 318 bp

3. Επεξεργασία των δοκιμαστικών ταινιών

3.1. Υβριδισμός (χειροκίνητος) – 1 Teststrip ανά δείγμα (45 °C, υδατόλουτρο με ανακίνηση)

Σημαντικό: Ρυθμίστε τη στάθμη του νερού στο υδατόλουτρο σε περίπου 1/2 του ύψους του Typing Tray. Θερμάνετε το υδατόλουτρο στους 45 °C ακριβώς. Ελέγξτε τη θερμοκρασία του νερού με ένα βαθμονομημένο θερμόμετρο. Προθερμασμένο Hybridization Buffer και Wash Solution A στους 45 °C. Φροντίστε να διαλυθούν πλήρως όλα τα ιζήματα που σχηματίζονται στους 2 °C έως 8 °C. Αφήστε τις δοκιμαστικές ταινίες, τα DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B και Color Developer να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Προετοιμάστε Typing Tray(s).

Αφαιρέστε ένα Teststrip για κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας καθαρή λαβίδα. Αγγίξτε τις δοκιμαστικές ταινίες μόνο με γάντια χωρίς πούδρα! Επισημάνετε τις δοκιμαστικές ταινίες έξω από τις γραμμές δείκτη με ένα μολύβι (χωρίς στυλό, μαρκαδόρους, κ.λπ.).

- Μεταφέρετε με πιπέτα **10 μl DNAT** (μπλε πώμα) στην κάτω γωνία κάθε λωρίδας που θα χρησιμοποιηθεί στα Typing Trays (μία λωρίδα ανά δείγμα).
- Προσθέστε **10 μl προϊόντος ενίσχυσης** στην αντίστοιχη σταγόνα DNAT.
- Αναμείξτε καλά με πιπέτα. (Το διάλυμα θα παραμείνει μπλε.)
- Αφήστε να σταθεί για **5 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέστε **1 ml Hybridization Buffer** (προθερμασμένο στους 45 °C) σε κάθε λωρίδα. Ανακινήστε απαλά τον δίσκο. (Το μπλε χρώμα θα εξαφανιστεί.)
- Εισαγάγετε **Teststrip** με την επισημασμένη πλευρά προς τα πάνω (ορατές γραμμές!) στις αντίστοιχες λωρίδες. Βυθίστε πλήρως.
- Επιάστε για **30 λεπτά** στους **45 °C** στην πλατφόρμα ανακίνησης του υδατόλουτρου.

Ρυθμίστε μέτρια συχνότητα ανακίνησης (περίπου 50 rpm), ώστε να αποφύγετε τη διαρροή. Κρατήστε κλειστό το κάλυμμα του υδατόλουτρου για να αποφύγετε μεταβολές στη θερμοκρασία.

- Στο τέλος της επώασης, αφαιρέστε τα διαλύματα υβριδισμού με αναρρόφηση υπό κενό ή με πιπέτα.

Συνεχίστε αμέσως. Μην αφήνετε τις δοκιμαστικές ταινίες να στεγνώσουν, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

3.2. Αυστηρή πλύση (45 °C, υδατόλουτρο με ανακίνηση)

- Προσθέστε **1 ml Wash Solution A** (προθερμασμένο στους 45 °C). Εκπλύνετε για λίγο (10 δευτ.).
Αφαιρέστε τα υγρά με αναρρόφηση κενού ή με πιπέτα.
- Προσθέστε **1 ml Wash Solution A** (45 °C).
- Επιάστε για **15 λεπτά** στους **45 °C** στο υδατόλουτρο ανακίνησης.
Αφαιρέστε τα υγρά με αναρρόφηση κενού ή με πιπέτα.
- Προσθέστε **1 ml Wash Solution A** (45 °C).
- Επιάστε για **15 λεπτά** στους **45 °C** στο υδατόλουτρο ανακίνησης.
Αφαιρέστε τα υγρά με αναρρόφηση κενού ή με πιπέτα.

3.3. Χρωματομετρική ανίχνευση (θερμοκρασία δωματίου, 22 °C ± 3 °C)

- Προσθέστε **1 ml Conjugate Solution**.
- Επώαστε για **15 λεπτά** σε **θερμοκρασία δωματίου** σε πιεζόμενο ή τροχιακό ανακινητήρα. Αφαιρέστε τα υγρά με αναρρόφηση κενού ή με πιπέτα.
- Προσθέστε **1 ml Wash Solution B**. Εκπλύνετε για λίγο (10 δευτ.). Αφαιρέστε τα υγρά με αναρρόφηση κενού ή με πιπέτα.
- Προσθέστε **1 ml Wash Solution B**.
- Επώαστε για **5 λεπτά** σε **θερμοκρασία δωματίου** σε πιεζόμενο ή τροχιακό ανακινητήρα. Αφαιρέστε τα υγρά με αναρρόφηση κενού ή με πιπέτα.
- Προσθέστε **1 ml Wash Solution B**.
- Επώαστε για **5 λεπτά** σε **θερμοκρασία δωματίου** σε πιεζόμενο ή τροχιακό ανακινητήρα. Αφαιρέστε τα υγρά με αναρρόφηση κενού ή με πιπέτα.
- Προσθέστε **1 ml Color Developer**.
- Επώαστε για **15 λεπτά** σε **θερμοκρασία δωματίου** σε σκοτεινό χώρο, σε πιεζόμενο ή τροχιακό ανακινητήρα. Με τη θετική αντίδραση, θα εμφανιστεί μωβ χρώση.
- Πλύνετε πολλές φορές τις δοκιμαστικές ταινίες με απεσταγμένο νερό. Αφήστε τις ταινίες να στεγνώσουν σε σκοτεινό χώρο, σε απορροφητικό χαρτί.

Μην εκθέτετε τις δοκιμαστικές ταινίες σε έντονο φως μετά το Color Development.

3.4. Υβριδισμός (αυτοματοποιημένος) - προαιρετικά, αντί για υδατόλουτρο και ανακινητήρα

Το όργανο για την αυτοματοποιημένη επεξεργασία των δοκιμαστικών ταινιών πρέπει να πληροί τις ακόλουθες απαιτήσεις:

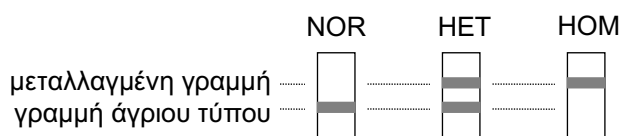
- Προγραμματιζόμενο προφίλ θερμοκρασίας και χρόνου, σύμφωνα με την ενότητα 3.1 έως 3.3 της διαδικασίας StripAssay®.
- Ενσωματωμένος σταθμός προθέρμανσης για τα Hybridization Buffer και Wash Solution A.
- Έλεγχος θερμοκρασίας δίσκων κατά τη διάρκεια των βημάτων υβριδισμού και αυστηρής πλύσης στους 45 °C ± 1 °C.
- Ενεργό σύστημα ψύξης του δίσκου για τη διασφάλιση ταχείας μείωσης της θερμοκρασίας για τα βήματα χρωματομετρικής ανίχνευσης σε θερμοκρασία δωματίου.
- Δυνατότητα ανακίνησης για δίσκο.
- Θερμαινόμενο καπάκι για τον δίσκο, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση των αντιδραστηρίων κατά την επώαση.
- Διανομή καθορισμένων όγκων αντιδραστηρίου.
- Αναρρόφηση αντιδραστηρίων.
- Ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετα αντιδραστήρια, ανάλογα με το όργανο που χρησιμοποιείται και τον αριθμό των δειγμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία σε μία ανάλυση. Διατίθενται ξεχωριστά StripAssay® Detection Reagents για 20 δοκιμές (REF CS-012) και 48 δοκιμές (REF CS-017).

VII. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο γονότυπος ενός δείγματος προσδιορίζεται με χρήση του εσώκλειστου Collector™ sheet. Τοποθετήστε το επεξεργασμένο Teststrip στα καθορισμένα πεδία, ευθυγραμμίστε το με το σχέδιο αναπαράστασης χρησιμοποιώντας την κόκκινη γραμμή δείκτη (επάνω) και την πράσινη γραμμή δείκτη (κάτω) και στερεώστε με αυτοκόλλητη ταινία.

Η θετική αντίδραση της ανώτερης γραμμής μάρτυρα υποδεικνύει τη σωστή λειτουργία του Conjugate Solution και του Color Developer. Αυτή η γραμμή πρέπει να έχει πάντα θετική χρώση.

Για κάθε πολυμορφική θέση, θα πρέπει να ληφθεί ένα από τα ακόλουθα πρότυπα χρώσης (Εικ. 2):



Εικ. 2: Γονότυποι – πρότυπα χρώσης στο Teststrip

	γραμμή άγριου τύπου	μεταλλαγμένη γραμμή	γονότυπος
NOR	θετικό	αρνητικό	κανονικό
HET	θετικό	θετικό	ετερόζυγο
HOM	αρνητικό	θετικό	ομόζυγο μεταλλαγμένο

Σημείωση: Οι εντάσεις χρώσης των θετικών γραμμών ενδέχεται να διαφέρουν. Αυτό δεν έχει καμία σημασία για το αποτέλεσμα.

Βλ. παραδείγματα των αποτελεσμάτων StripAssay® στη σελίδα 18 (Εικ. 3).

Ορισμένες από τις μεταλλάξεις που καλύπτονται από το FMF StripAssay® βρίσκονται εντός μερικών νουκλεοτιδίων στο γονίδιο *MEFV*. Στις δοκιμαστικές ταινίες, αντιπροσωπεύονται από έναν κοινό ανιχνευτή άγριου τύπου, έτσι ώστε οι 12 μεταλλάξεις να καλύπτονται μόνο από 8 ανιχνευτές άγριου τύπου:

γραμμή	ανιχνευτής άγριου τύπου	μετάλλαξη
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

Τα δείγματα που είναι σύνθετα ετερόζυγα για δύο από αυτές τις μεταλλάξεις (π.χ. M694V + M694I, M694V + K695R) δεν θα διαθέτουν το κοινό σήμα άγριου τύπου (βλ. παραδείγματα I και J, σελίδα 18).

Όπως συμβαίνει με κάθε διαγνωστική δοκιμή, τα αποτελέσματα του FMF StripAssay® θα ερμηνεύονται στο πλαίσιο του συνολικού κλινικού φαινοτύπου του ασθενούς και άλλων ιατρικών ερευνών που έχει στη διάθεσή του ο ιατρός. Η ViennaLab Diagnostics GmbH δεν είναι υπεύθυνη για τυχόν κλινικές αποφάσεις που λαμβάνονται.

VIII. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η **ακρίβεια** του FMF StripAssay® προσδιορίστηκε με ανάλυση 173 προτυποποιημένων δειγμάτων γονιδιωματικού DNA. Τα αποτελέσματα ήταν απολύτως σύμφωνα με τη μέθοδο αναφοράς (αλληλουχία Sanger, ηλεκτροφόρηση γέλης με μετουσιωτική βαθμίδωση (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis) και πολυμορφισμός μήκους θραύσματος περιορισμού (RFLP, restriction fragment length polymorphism). Ο προσδιορισμός ανίχνευσε σωστά 251 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (= 100% θετική ποσοστιαία συμφωνία) και 103 αλληλόμορφα άγριου τύπου (= 100% αρνητική ποσοστιαία συμφωνία).

Η **πιστότητα** του FMF StripAssay® αξιολογήθηκε ως μεταβλητότητα μεταξύ αντιγράφων, χειριστών, ημερών, παρτίδων αντιδραστηρίων, θερμοκυκλοποιητών και συσκευών υβριδισμού (χειροκίνητος και ημιαυτόματος υβριδισμός). Σε συνολικά 106 επαναλήψεις δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν υπό τις εξεταζόμενες παραμέτρους, όλες οι δοκιμές έδειξαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα γονότυπου. Υπήρξαν μόνο αμελητέες ορατές διαφορές στην ένταση χρώσης των δοκιμαστικών ταινιών και δεν παρατηρήθηκε χρώση στο φόντο. Το FMF StripAssay® επικυρώθηκε στα AB GeneAmp® PCR System 2700, AB GeneAmp® PCR System 9700, AB Veriti και MJ Research PTC-200, που αντιπροσωπεύουν ρυθμό θέρμανσης και ψύξης στο εύρος 1,7 έως 4,2 °C/δευτ. και 1,4 έως 3,7 °C/δευτ., αντιστοίχως.

Η χρήση άλλων θερμοκυκλοποιητών πρέπει να επαληθεύεται από τον χρήστη.

Η **αναλυτική ειδικότητα** εξασφαλίζεται πρώτα και κυρίως από την επιλογή των ειδικών για το γονίδιο εκκινητών και των ειδικών για αλληλόμορφα ανιχνευτών σύλληψης, καθώς και με την επιλογή αυστηρών συνθηκών αντίδρασης. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές ελέγχθηκαν για πιθανές ομολογίες σε όλες τις αλληλουχίες που δημοσιεύθηκαν σε βάσεις δεδομένων γονιδίων με ανάλυση σύγκρισης αλληλουχιών. Ως εκ τούτου, έχει εξασφαλιστεί η ανιχνευσιμότητα όλων των σχετικών γονότυπων. Η πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ανιχνευτών σύλληψης επαληθεύτηκε με συνθετικό DNA που έφερε το αντίστοιχο γονιδιακό θραύσμα. Δεν παρατηρήθηκε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα.

Κλινικές επιδόσεις: Η αξιολόγηση των κλινικών επιδόσεων των FMF StripAssays® προκειμένου να υποστηριχθούν τα κλινικά στοιχεία περιελάμβανε μια συστηματική ανασκόπηση των διαθέσιμων δεδομένων και των ισχυόντων στοιχείων. Ως αποτέλεσμα της βιβλιογραφικής έρευνας, εντοπίστηκαν 22 δημοσιεύσεις που αφορούσαν την ασφάλεια και τις επιδόσεις του FMF StripAssays®, οι οποίες καταδεικνύουν την κλινική χρησιμότητα του FMF StripAssay®. Δεν έχουν εντοπιστεί ανεπιθύμητες ενέργειες ή αποκλίσεις στις μελέτες σύγκρισης μεθόδων. Συνοπτικά, οι κλινικές επιδόσεις, τα οφέλη και η ασφάλεια του FMF StripAssay® επιβεβαιώνονται όταν η συσκευή χρησιμοποιείται όπως προβλέπεται για τη διάγνωση του Οικογενούς Μεσογειακού Πυρετού (FMF, Familial Mediterranean Fever).

IX. ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Υποβλήθηκαν σε δοκιμή πέντε παρεμβαλλόμενες ουσίες (αιμοσφαιρίνη, ανοσοσφαιρίνη G, ίχνη αίματος, αιθανόλη και EDTA) που δυνητικά υπάρχουν σε παρασκευάσματα DNA που προέρχονται από αίμα με EDTA. Οι επιδράσεις τους στην PCR αξιολογήθηκαν σε τρία δείγματα κεκαθαρμένου DNA ενοφθαλμισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις ουσιών και συγκρίθηκαν με τους μάρτυρές τους χωρίς προσθήκη παρεμβαλλομένων ουσιών. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν.

Η τελική συγκέντρωση < 10 μM αιμοσφαιρίνης, 0,1 μM ανοσοσφαιρίνης G, < 1% περιφερικού αίματος, 1,25% αιθανόλης ή 0,1 mM EDTA στην αντίδραση δεν εμφάνισε παρεμβολές στις επιδόσεις του StripAssay®.

X. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Το FMF StripAssay® έχει σχεδιαστεί αποκλειστικά για την ανίχνευση 12 γνωστών μεταλλάξεων όπως αναφέρονται στην ενότητα III, οι οποίες αντιπροσωπεύονται από ειδικούς για αλληλόμορφα ανιχνευτές σύλληψης στις δοκιμαστικές ταινίες. Δεν μπορούν να ανιχνευθούν άλλες μεταλλάξεις *MEFV* που ενδεχομένως υπάρχουν στο δείγμα ενός ασθενούς.

Σπάνιες ή ιδιωτικές παραλλαγές σε θέσεις πρόσδεσης εκκινητών και ανιχνευτών μπορεί να οδηγήσουν σε αποτυχία ενίσχυσης και έλλειψη σημάτων στις δοκιμαστικές ταινίες.

Δείγματα DNA που λαμβάνονται με μεθόδους διαφορετικές από τα αντιδραστήρια και το πρωτόκολλο που παρέχονται με το FMF StripAssay® μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να εμφανίζουν ασθενή ή ελλείποντα σήματα για άγριου τύπου και μεταλλαγμένο E148Q. Το αποτέλεσμα οφείλεται στην εξασθένηση της αποτελεσματικότητας της PCR για αυτό το συγκεκριμένο θραύσμα και έχει παρατηρηθεί με πολλά δημοφιλή κιτ εκχύλισης DNA. Η προθέρμανση αυτών των δειγμάτων DNA στους 98 °C για 10 λεπτά, ακολουθούμενη αμέσως από ψύξη σε πάγο ή σε κρύο μπλοκ πριν από την έναρξη της PCR, μπορεί να αποκαταστήσει πλήρως τις κανονικές αποδόσεις της PCR.

Το FMF StripAssay® προορίζεται μόνο για επαγγελματική εργαστηριακή χρήση.

XI. ΘΕΜΑΤΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

- Για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων, απαιτείται πλήρης κατανόηση της διαδικασίας που περιγράφεται εδώ, καθώς και τυπικές εργαστηριακές τεχνικές και κατάλληλος εξοπλισμός.
- Μη χρησιμοποιείτε τα κιτ StripAssay® μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Μετά το πρώτο άνοιγμα του αρχικού περιέκτη, τα αντιδραστήρια StripAssay® παραμένουν σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην εξωτερική ετικέτα του κιτ, εφόσον φυλάσσονται σωστά στους 2 °C έως 8 °C.
- Χρησιμοποιήστε αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας μίας χρήσης με φίλτρα, για να αποφύγετε τη μικροβιακή μόλυνση και τη διασταυρούμενη μόλυνση αντιδραστηρίων ή δειγμάτων. Μην εναλλάσσετε πώματα φιαλών.
- Μόνο για μία χρήση.

XII. ΑΣΦΑΛΕΙΑ

- Μην καταναλώνετε ποτό ή φαγητό, μην καπνίζετε ή εφαρμόζετε καλλυντικά σε καθορισμένους χώρους εργασίας. Κατά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων κιτ, φοράτε ποδιά εργαστηρίου και γάντια μίας χρήσης. Στη συνέχεια, πλύνετε σχολαστικά τα χέρια σας.
- Χειριστείτε τα δείγματα ως δυνητικά μολυσματικά. Καθαρίστε και απολυμάνετε σχολαστικά όλα τα υλικά και τις επιφάνειες που έχουν έρθει σε επαφή με δείγματα. Απορρίψτε όλα τα απόβλητα που σχετίζονται με κλινικά δείγματα σε ένα δοχείο βιολογικά επικίνδυνων υλικών.
- Αποφύγετε την επαφή του DNAT και του Color Developer με το δέρμα, τα μάτια ή τους βλεννογόνους. Εάν προκύψει επαφή, πλύνετε αμέσως με μεγάλες ποσότητες νερού. Σε περίπτωση έκχυσης, αραιώστε με νερό πριν σκουπίσετε.
- Τηρείτε όλους τους τοπικούς και ομοσπονδιακούς κανονισμούς ασφάλειας και περιβάλλοντος που ενδέχεται να ισχύουν.

XIII. ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ

Τεχνική υποστήριξη μπορεί να ληφθεί από:

- τον τοπικό διανομέα της ViennaLab Diagnostics (www.viennalab.com/distribution)
- Εκπαιδευτικά βίντεο (www.viennalab.com/support)
- εγχειρίδιο του StripAssay® (www.viennalab.com/support)
- οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων του StripAssay® (www.viennalab.com/support)
- επικοινωνία στη διεύθυνση techhelp@viennalab.com

XIV. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

XV. ΣΧΟΛΙΑ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ

Κάθε σοβαρό περιστατικό που προκύπτει σε σχέση με το StripAssay® θα πρέπει να αναφέρεται στην αρμόδια αρχή της χώρας και στον κατασκευαστή.

XVI. ΣΥΜΒΟΛΑ



Αριθμός καταλόγου



Κωδικός παρτίδας



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Συμμορφώνεται με τον ευρωπαϊκό κανονισμό IVD 2017/746
Αριθμός ταυτοποίησης κοινοποιημένου οργανισμού



Επαρκές για <n> δοκιμές



Όρια θερμοκρασίας αποθήκευσης



Ημερομηνία λήξης



Προσοχή



Κατασκευαστής

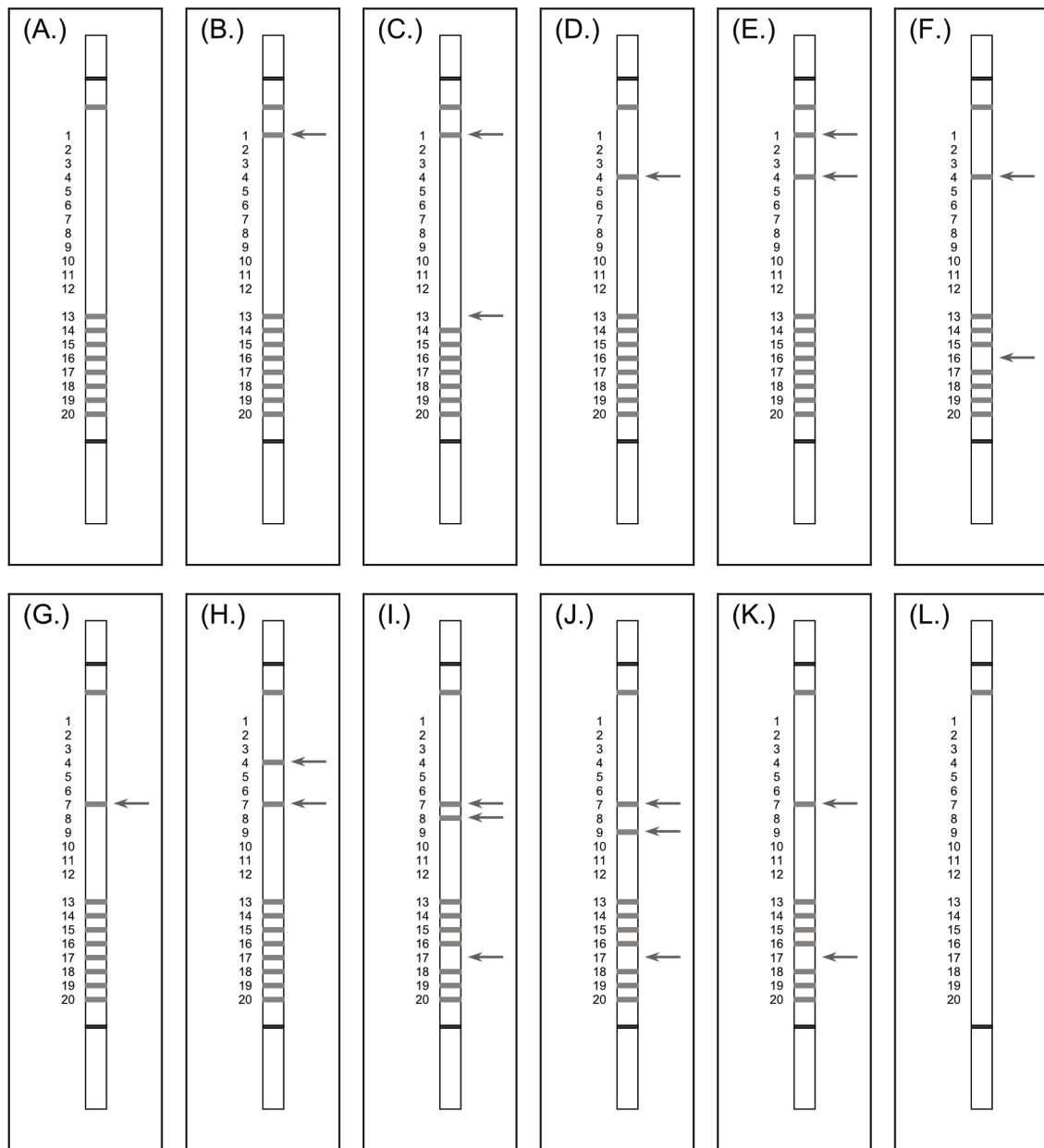


Ημερομηνία κατασκευής



Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης

XVII. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ



Εικ. 3: Παραδείγματα αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με το FMF StripAssay®

- | | |
|------------------------------------|--|
| (A.) κανονικό | (G.) M694V ετερόζυγο |
| (B.) E148Q ετερόζυγο | (H.) M680I (G/C) - M694V ετερόζυγο |
| (C.) E148Q ομόζυγο | (I.) M694V - M694I ετερόζυγο |
| (D.) M680I (G/C) ετερόζυγο | (J.) M694V - K695R ετερόζυγο |
| (E.) E148Q - M680I (G/C) ετερόζυγο | (K.) M694V ομόζυγο |
| (F.) M680I (G/C) ομόζυγο | (L.) αρνητικός μάρτυρας ή αποτυχία PCR |

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

XVIII. ΣΧΕΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

REF		Σ
4-230	FMF StripAssay®	20 δοκιμές
4-390	FMF-SAA1 StripAssay®	20 δοκιμές
CS-012	StripAssay® Detection Reagents	20 δοκιμές
CS-017	StripAssay® Detection Reagents 48	48 δοκιμές
2-014	GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System	100 εκχυλίσεις
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 εκχυλίσεις
6-080	Typing Trays	5

Διανομέας:



Κατασκευαστής:



ViennaLab Diagnostics GmbH

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

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com