

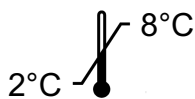
# FMF StripAssay<sup>®</sup>

Istruzioni per l'uso

**REF**



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



Versione: rev 1.0 / Italiano  
eIFU e altre lingue disponibili sul sito  
[www.viennalab.com](http://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](mailto:info@viennalab.com)

w: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

**INDICE**

I.	DESTINAZIONE D'USO.....	4
II.	BASI .....	4
III.	METODOLOGIA.....	4
IV.	COMPONENTI DEL KIT .....	6
V.	MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI.....	7
VII.	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI .....	12
VIII.	VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI.....	14
IX.	SOSTANZE INTERFERENTI.....	14
X.	LIMITI DEL TEST .....	15
XI.	CONSIDERAZIONI SULLA QUALITÀ.....	15
XII.	SICUREZZA .....	15
XIII.	ASSISTENZA TECNICA .....	16
XIV.	BIBLIOGRAFIA .....	16
XV.	FEEDBACK AL FABBRICANTE .....	16
XVI.	SIMBOLI.....	17
XVII.	ESEMPI DI RISULTATI DEI TEST.....	18
XVIII.	PRODOTTI CORRELATI .....	20

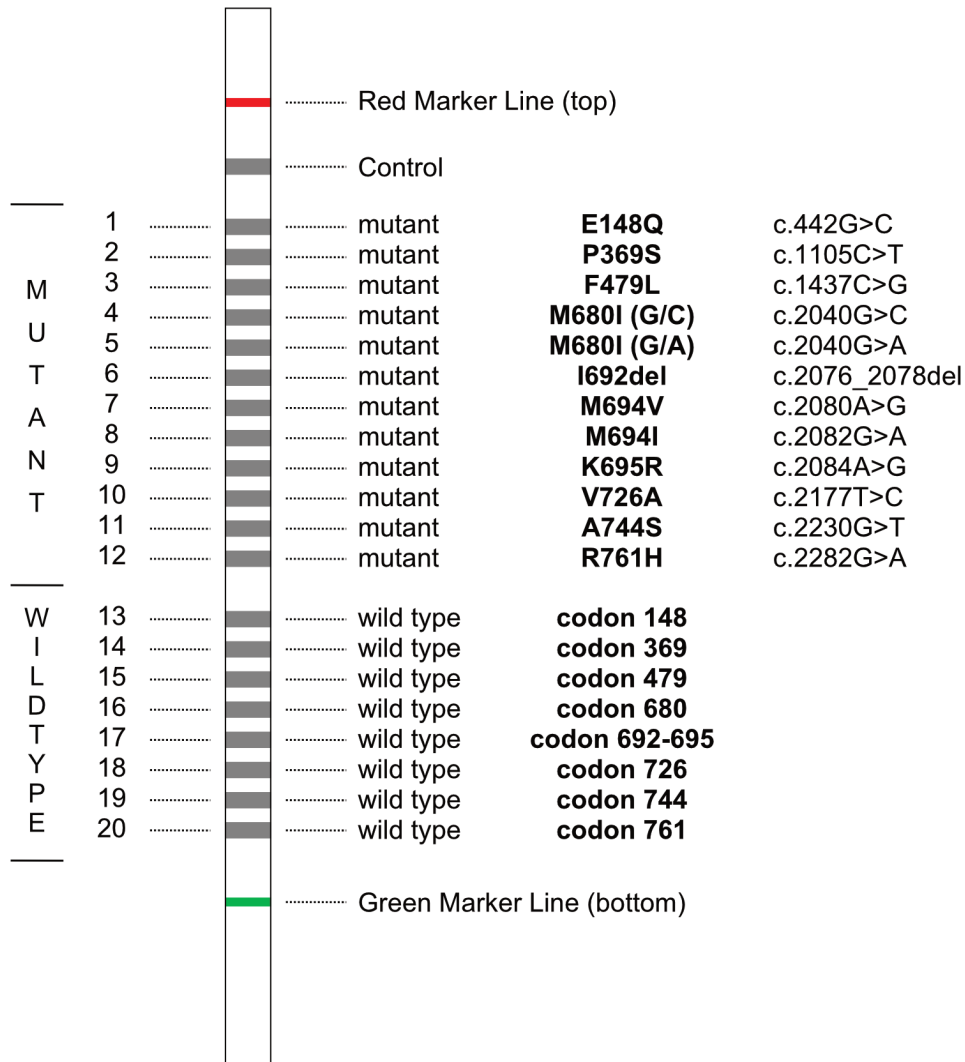
**CRONOLOGIA REVISIONI:**

<b>versione</b>	<b>data</b>	<b>descrizione</b>
rev 1.0	2022-11	Aggiunta alla versione 2022-01 di contenuti relativi all'IVDR.

---

---

La Sintesi relativa alla sicurezza e alla prestazione (SSP) di StripAssay® è reperibile nella Banca dati europea dei dispositivi medici (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> o presso il fabbricante.



EN	IT
mutant	mutante
wildtype	wild type
control	controllo
red marker line (top)	linea di demarcazione rossa (in alto)
green marker line (bottom)	linea di demarcazione verde (in basso)

**Fig. 1: Design della teststrip**

**Nota:** Le Teststrips non sono disegnate in dimensioni reali e non devono essere utilizzate per l'interpretazione dei risultati.

## **I. DESTINAZIONE D'USO**

FMF StripAssay® è un test genetico qualitativo per l'analisi mirata di 12 mutazioni frequenti nel gene *MEFV* associate alla febbre mediterranea familiare (FMF, familial mediterranean fever). Per il test viene utilizzato DNA genomico estratto da campioni di sangue periferico intero. FMF StripAssay® è concepito come ausilio per la diagnosi di FMF in pazienti che presentano un quadro sintomatologico clinico coerente con la FMF, o in parenti a rischio di un paziente con una mutazione di *MEFV* patogena identificata. È possibile eseguire StripAssay® in modo manuale o semi-automatico.

Per uso diagnostico *in vitro* sull'uomo.

## **II. BASI**

La FMF è la più comune malattia autoinfiammatoria monogenica ed è caratterizzata da episodi febbrili ricorrenti, accompagnati da dolore all'addome (peritonite), al torace (pleurite) o alle articolazioni (artrite) e da eritema cutaneo simile all'erisipela. L'amiloidosi sistemica reattiva (AA) è nota come la principale complicanza a lungo termine, con manifestazioni gravi e prognosi sfavorevole. La FMF ha un quadro ereditario autosomico recessivo nella maggior parte dei casi e si osserva principalmente in pazienti provenienti da popolazioni mediterranee o mediorientali. Numerose varianti all'interno del gene della febbre mediterranea (*MEFV*) sono state descritte come difetti molecolari che causano la FMF. Il gene *MEFV* è localizzato sul cromosoma 16p13.3 e comprende 10 esoni, che codificano una proteina di 781 amminoacidi nota come pirina. La rappresentazione clinica della FMF può essere complessa, pertanto gli esami genetici per le mutazioni di *MEFV* sono un possibile metodo per corroborare la diagnosi.

## **III. METODOLOGIA**

FMF StripAssay® si basa sulla reazione a catena della polimerasi (PCR, polymerase chain reaction) e sull'ibridazione inversa. La procedura prevede tre fasi: (1) isolamento del DNA, (2) amplificazione PCR mediante primer biotinilati, (3) ibridazione dei prodotti di amplificazione con una Teststrip contenente sonde oligonucleotidiche specifiche per allele immobilizzate come una matrice di linee parallele (Fig. 1). Le sequenze biotinilate legate vengono rilevate con streptavidina-fosfatasi alcalina e substrati colorati.

FMF StripAssay® rileva le seguenti mutazioni nel locus genico di *MEFV*:

	<b>nome tradizionale</b>	<b>nomenclatura HGVS</b>		<b>RefSNP</b>
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

Sequenza di riferimento (RefSeq, Reference Sequence):



NM\_000243.2

NG\_007871.1

È possibile eseguire il test manualmente o in modo semi-automatico, utilizzando strumenti progettati per l'automazione della processazione delle Teststrips (vedere la sezione VI. 3.4).

IV. COMPONENTI DEL KIT

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 ( <i>tappo giallo</i> )	500 µl	2 x 500 µl	500 µl
4. Taq Dilution Buffer ( <i>tappo trasparente</i> )	500 µl	500 µl	500 µl
5. Taq DNA Polymerase (5 U/µl) ( <i>tappo rosso</i> )	75 U	125 U	75 U
6. DNAT ( <i>tappo blu</i> )	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Avvertenza: DNAT contiene 1,6% NaOH                      H315: Provoca irritazione cutanea                      H319: Provoca grave irritazione oculare                      P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso                      P337 + P313: Se l'irritazione degli occhi persiste: consultare un medico</p>			
7. Typing Trays	3	---	1
8. Teststrips	20	2 x 24	5
9. Hybridization Buffer ( <i>tappo bianco</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
10. Wash Solution A ( <i>tappo bianco</i> )	80 ml	200 ml	80 ml
11. Conjugate Solution ( <i>tappo trasparente</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
12. Wash Solution B ( <i>tappo trasparente</i> )	80 ml	200 ml	80 ml
13. Color Developer ( <i>tappo marrone</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Avvertenza: Color Developer contiene ≤0,4% acido maleico                      H317: Può provocare una reazione allergica cutanea                      P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso                      P302 + P352: In caso di contatto con la pelle: lavare abbondantemente con acqua                      P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico</p>			
14. Istruzioni per l'uso	1	1	1
15. Collector™ Sheet	1	3	1

**Nota:** Conservare tutti i reagenti tra 2°C e 8°C quando non vengono utilizzati.

nome del componente	composizione
Lysis Solution	soluzione ipotonica contenente KHCO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> Cl, EDTA
GENXTRACT™ Resin	Chelex 100 Resin MB in soluzione tamponata
Amplification Mix	oligonucleotidi marcati con biotina in 5' specifici per sequenza, una miscela equimolare di deossiribonucleotidi trifosfati (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), tampone solfato di ammonio, glicerolo, 0,05% azoturo di sodio
Taq Dilution Buffer	tampone per Taq DNA Polymerase, che include (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e MgCl <sub>2</sub> , 0,05% azoturo di sodio
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	Taq DNA Polymerase a una concentrazione di 5 U/µl
DNAT	soluzione basica contenente 1,6% idrossido di sodio e un colorante blu che indica una variazione di pH

Typing Trays	vassoio di plastica con otto pozzetti
nome del componente	composizione
Teststrips	sonde oligonucleotidiche specifiche per allele e un controllo di ibridazione immobilizzato sotto forma di matrice di linee parallele su una membrana con supporto in poliestere, delimitata da una linea rossa in alto e una verde in basso
Hybridization Buffer	tampone fosfato con <2% detergente
Wash Solution A	tampone citrato con <1% detergente
Conjugate Solution	fosfatasi alcalina coniugata con streptavidina, diluita in un tampone a base salina con 0,05% azoturo di sodio
Wash Solution B	tampone Tris contenente <2% detergente e 0,05% azoturo di sodio
Color Developer	il substrato colorato per la fosfatasi alcalina contiene blu nitrotetrazolo (NBT, nitro blue tetrazolium) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate).
Istruzioni per l'uso	carta stampata
Collector™ Sheet	carta stampata

## V. MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Oltre alle attrezzature standard dei laboratori di biologia molecolare, è necessario quanto segue:

- Thermoblock o Thermomixer per provette di reazione da 1,5 ml, con controllo della temperatura fino a 99°C
- Microcentrifuga regolabile in grado di raggiungere 3.000-12.000 giri al minuto (1.000-12.000 x g)
- Termociclatore con coperchio riscaldato (per le specifiche sulle velocità di rampa, vedere la sezione VIII)
- Bagnomaria con piattaforma per agitazione, coperchio e temperatura regolabile (45°C ± 1°C)
- Agitatore (oscillante o orbitale)

### Opzionale:

- Apparecchio per aspirazione sotto vuoto
- Agitatore termico per piastra da microtitolazione con coperchio e temperatura regolabile (45°C ± 1°C), es. PST-60 HL (Biosan) o dispositivo equivalente
- Strumento per l'ibridazione automatizzata, regolabile in base al profilo tempo-temperatura come descritto nella sezione VI. 3.4, es. DYNABLOT Heat (Dynex) o dispositivo equivalente
- Apparecchiatura per elettroforesi su gel di agarosio (per il controllo dei prodotti di amplificazione)

## VI. PROCEDURA DEL TEST

### 1. Preparazione del campione

**Campione:** Utilizzare sangue fresco o congelato con anticoagulante EDTA. Il sangue contenente eparina o citrato non è stato testato. Non conservare il sangue per più di 3 giorni a temperatura ambiente o per più di 1 settimana tra 2°C e 8°C prima dell'uso. Non utilizzare sangue che è stato conservato congelato per più di un anno o che ha subito più di tre cicli di congelamento/scongelo. Per il prelievo e il trasporto dei campioni, seguire le istruzioni per l'uso della provetta di raccolta del sangue in EDTA e le raccomandazioni generali per il campionamento del sangue.

**Estrazione del DNA:** Portare i campioni di sangue a temperatura ambiente. Mescolare accuratamente, capovolgendo più volte le provette di raccolta del sangue. Attendere che Lysis Solution e GENXTRACT™ Resin raggiungano la temperatura ambiente.

- Pipettare **100 µl di campione di sangue** in una microprovetta da 1,5 ml con tappo a vite.
- Aggiungere **1 ml di Lysis Solution**, chiudere la provetta e mescolare capovolgendo più volte.
- Lasciare riposare per **15 min.** a temperatura ambiente.
- Centrifugare per **5 min.** a **3.000 giri al minuto** (circa 1.000 x g) in una microcentrifuga.
- Rimuovere e scartare 1 ml dalla parte superiore del surnatante.
- Aggiungere **1 ml di Lysis Solution**, chiudere la provetta e mescolare capovolgendo più volte.
- Centrifugare per **5 min.** a **12.000 giri al minuto** (circa 12.000 x g) in una microcentrifuga.
- Rimuovere e scartare il surnatante, tranne circa 50 µl di un sedimento molle visibile.
- Risospendere GENXTRACT™ Resin roteando a fondo il flacone.
- Aggiungere **200 µl di GENXTRACT™ Resin** al sedimento. Chiudere la provetta e agitare su vortex per 10 s.

**Nota:** GENXTRACT™ Resin si sedimenta rapidamente. Rimettere in sospensione ogni volta, immediatamente prima di prelevare un'altra aliquota.

- Incubare per **20 min.** a **56°C**. Agitare su vortex per 10 s.
- Incubare per **10 min.** a **98°C**. Agitare su vortex per 10 s.
- Centrifugare per **5 min.** a **12.000 giri al minuto** in una microcentrifuga. Raffreddare su ghiaccio.

Il surnatante risultante contiene un template di DNA adatto all'uso immediato nella PCR. Per un'ulteriore conservazione, è necessario trasferire il surnatante in una nuova provetta e tenerlo refrigerato (tra 2°C e 8°C; fino a una settimana) o congelarlo tra -30°C e -15°C (a lungo termine).

L'impiego di altri metodi di isolamento del DNA con FMF StripAssay® non è stato convalidato. Se si utilizzano altri sistemi di estrazione del DNA, la concentrazione e la purezza del DNA devono rispettivamente rientrare in un intervallo compreso tra 2 e 10 ng/µl e un rapporto OD<sub>A260/280</sub> fra 1,7 e 2,0. Concentrazioni di DNA più elevate devono essere diluite nell'intervallo raccomandato prima dell'inserimento nella PCR.

## 2. Amplificazione in vitro (PCR)

**Importante:** Tenere sempre refrigerati tutti i reagenti per la PCR e i template di DNA.

- Preparare ogni volta una quantità adeguata di soluzione di lavoro (1:25, conc. finale 0,2 U/μl) di **Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, tappo rosso) in **Taq Dilution Buffer** (tappo trasparente) per il numero di campioni da analizzare, più il **controllo di reazione negativa** (NTC, no-template contol).

componente	per reazione	es. 10 reazioni
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,2 μl	2 μl
Taq Dilution Buffer	4,8 μl	48 μl
soluzione di lavoro	5 μl	50 μl

- Preparare una provetta di reazione per ogni campione da amplificare. Mettere le provette su ghiaccio.
- Per ogni campione, preparare un mix di reazione finale per PCR su ghiaccio:
  - 15 μl Amplification Mix** (tappo giallo)
  - 5 μl Taq DNA Polymerase diluito** (1 U)
  - 5 μl template di DNA**

**Nota:** Si consiglia di preparare per tutti i campioni un Master Mix contenente Amplification Mix e Taq DNA Polymerase diluito. Prima pipettare 20 μl di Master Mix in ogni provetta per PCR e poi aggiungere il template di DNA. Includere un controllo di reazione negativa in ogni analisi, utilizzando acqua per PCR al posto del DNA (o preferibilmente il controllo negativo per l'estrazione del DNA).

In linea generale, preparare soluzioni di lavoro / Master Mix con un volume in eccesso del 10% per compensare le imprecisioni del pipettaggio.

- Chiudere ermeticamente le provette. Preriscaldare il termociclatore a 94°C.
- Inserire le provette di reazione ed eseguire il seguente programma di termociclaggio:
  - pre-PCR: 94°C/2 min.**
  - termociclaggio: 94°C/15 s - 58°C/30 s - 72°C/30 s (35 cicli)**
  - estensione finale: 72°C/3 min.**
- Conservare i prodotti di amplificazione su ghiaccio o tra 2°C e 8°C per un utilizzo successivo.

**Opzionale:** Analizzare i prodotti di amplificazione mediante elettroforesi su gel (es. gel di agarosio al 3%).

Lunghezze dei frammenti: 206, 236, 295, 318 bp

### 3. Processazione delle Teststrips

#### 3.1. Ibridazione (manuale) – 1 Teststrip per campione (45°C, bagnomaria in agitazione)

**Importante:** Regolare il livello dell'acqua del bagnomaria a circa ½ dell'altezza del Typing Tray. Riscaldare il bagnomaria esattamente a 45°C. Controllare la temperatura dell'acqua con un termometro calibrato. Preriscaldare Hybridization Buffer e Wash Solution A a 45°C. Accertarsi che tutti i precipitati formati tra 2°C e 8°C si dissolvano completamente. Attendere che Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B e Color Developer raggiungano la temperatura ambiente. Preparare uno o più Typing Tray.

Estrarre una Teststrip per ogni campione usando una pinzetta pulita. Toccare le Teststrips solo con guanti senza polvere. Contrassegnare le Teststrips al di fuori delle linee di demarcazione con una matita (non penne a sfera, pennarelli, ecc.).

- Pipettare **10 µl di DNAT** (tappo blu) nell'angolo inferiore di ogni corsia da utilizzare nei Typing Trays (una corsia per campione).
- Aggiungere **10 µl di prodotto di amplificazione** nella goccia corrispondente di DNAT.
- Mescolare accuratamente con una pipetta (la soluzione rimarrà blu).
- Lasciare riposare per **5 min.** a temperatura ambiente.
- Aggiungere **1 ml di Hybridization Buffer** (preriscaldato a 45°C) in ogni corsia. Agitare delicatamente il vassoio (il colore blu scompare).
- Inserire la **Teststrip** con il lato stampato rivolto verso l'alto (linee visibili) nelle rispettive corsie. Immergere completamente.
- Incubare per **30 min.** a **45°C** sulla piattaforma per agitazione del bagnomaria.

Impostare una frequenza di agitazione moderata (circa 50 giri al minuto) per evitare fuoriuscite. Per evitare variazioni di temperatura, tenere chiuso il coperchio del bagnomaria.

- Al termine dell'incubazione, rimuovere le soluzioni di ibridazione mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.

Procedere immediatamente. Non lasciare asciugare le Teststrips per tutta la durata della procedura.

#### 3.2. Lavaggio di stringenza (45°C, bagnomaria in agitazione)

- Aggiungere **1 ml di Wash Solution A** (preriscaldato a 45°C). Risciacquare brevemente (10 s).  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution A** (45°C).
- Incubare per **15 min.** a **45°C** nel bagnomaria in agitazione.  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution A** (45°C).
- Incubare per **15 min.** a **45°C** nel bagnomaria in agitazione.  
Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.

### 3.3. Rilevamento colorimetrico (temperatura ambiente, 22°C ± 3°C)

- Aggiungere **1 ml di Conjugate Solution**.
- Incubare per **15 min.** a **temperatura ambiente** su un agitatore oscillante o orbitale. Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution B**. Risciacquare brevemente (10 s). Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution B**.
- Incubare per **5 min.** a **temperatura ambiente** su un agitatore oscillante o orbitale. Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Wash Solution B**.
- Incubare per **5 min.** a **temperatura ambiente** su un agitatore oscillante o orbitale. Rimuovere i liquidi mediante aspirazione sotto vuoto o pipettaggio.
- Aggiungere **1 ml di Color Developer**.
- Incubare per **15 min.** a **temperatura ambiente** al buio su un agitatore oscillante o orbitale. Una colorazione viola apparirà in seguito a reazione positiva.
- Lavare le Teststrips più volte con acqua distillata.  
Lasciare asciugare le strisce al buio su carta assorbente.

Non esporre le Teststrips a luce intensa dopo lo sviluppo del colore.

### 3.4. Ibridazione (automatizzata) - opzionale, al posto del bagnomaria e dell'agitatore

Uno strumento per la processazione automatizzata delle Teststrips deve soddisfare i seguenti requisiti:

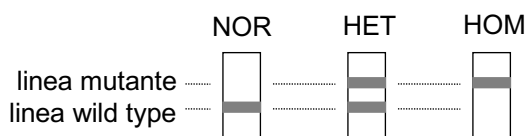
- Profilo con temperatura e tempo programmabili, in base alle sezioni da 3.1 a 3.3 della procedura StripAssay®.
- Stazione di preriscaldamento integrata per Hybridization Buffer e Wash Solution A.
- Controllo della temperatura dei vassoi durante le fasi di ibridazione e lavaggio di stringenza a 45°C ± 1°C.
- Sistema di raffreddamento attivo del vassoio per garantire una rapida diminuzione della temperatura per le fasi di rilevamento colorimetrico a temperatura ambiente.
- Possibilità di agitare il vassoio.
- Coperchio riscaldato per il vassoio, per evitare l'evaporazione dei reagenti durante l'incubazione.
- Erogazione di volumi definiti dei reagenti.
- Aspirazione dei reagenti.
- A seconda dello strumento utilizzato e del numero di campioni elaborati in una sessione, potrebbero essere necessari reagenti aggiuntivi. Sono disponibili StripAssay® Detection Reagents distinti per 20 test (REF CS-012) e 48 test (REF CS-017).

## VII. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il genotipo di un campione viene determinato utilizzando il Collector™ Sheet accluso. Collocare la Teststrip processata in uno dei campi designati, allinearla allo schema utilizzando la linea di demarcazione rossa (in alto) e la linea di demarcazione verde (in basso) e fissarla con del nastro adesivo.

Una reazione positiva sulla linea di controllo superiore indica la corretta funzionalità di Conjugate Solution e Color Developer. Questa linea deve sempre risultare positiva.

Per ogni posizione di polimorfismo, si deve ottenere uno dei seguenti pattern di colorazione (Fig. 2):



**Fig. 2: Genotipi - pattern di colorazione sulla Teststrip**

	linea wild type	linea mutante	genotipo
NOR	<b>positiva</b>	negativa	normale
HET	<b>positiva</b>	<b>positiva</b>	eterozigote
HOM	negativa	<b>positiva</b>	mutante omozigote

**Nota:** L'intensità di colorazione delle linee positive può variare, ma questo non è significativo ai fini del risultato.

**Vedere gli esempi** di risultati di StripAssay® a pagina 18 (Fig. 3).

Alcune delle mutazioni coperte da FMF StripAssay® si trovano all'interno di pochi nucleotidi del gene *MEFV*. Queste sono rappresentate sulle Teststrips da una sonda wild type comune, così le 12 mutazioni sono coperte solo da 8 sonde wild type:

<b>linea</b>	<b>sonda wild type</b>	<b>mutazione</b>
13	codone 148	E148Q
14	codone 369	P369S
15	codone 479	F479L
16	codone 680	M680I (G/C), M680I (G/A)
17	codone 692-695	I692del, M694V, M694I, K695R
18	codone 726	V726A
19	codone 744	A744S
20	codone 761	R761H

I campioni che sono eterozigoti composti per due di queste mutazioni (es. M694V + M694I, M694V + K695R) saranno privi del segnale wild type comune (vedere esempi I e J a pagina 18).

Come per qualsiasi test diagnostico, i risultati di FMF StripAssay® devono essere interpretati nel contesto del fenotipo clinico complessivo del paziente e di altre indagini cliniche a disposizione del medico. ViennaLab Diagnostics GmbH non è responsabile delle decisioni cliniche adottate.

## VIII. VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

L'**accuratezza** di FMF StripAssay® è stata determinata analizzando 173 campioni di DNA genomico precedentemente tipizzati. I risultati concordavano completamente con il metodo di riferimento (sequenziamento di Sanger, elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis) e polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP, restriction fragment length polymorphism)). Il test ha rilevato correttamente 251 alleli mutanti (= 100% percentuale di concordanza positiva) e 103 alleli wild type (= 100% percentuale di concordanza negativa).

La **precisione** di FMF StripAssay® è stata valutata in termini di variabilità tra le repliche, gli operatori, i giorni, i lotti dei reagenti, i termociclatori e i dispositivi di ibridazione (ibridazione manuale e semi-automatica). In 106 repliche complessive eseguite sulla base dei parametri studiati, tutti i test hanno mostrato i risultati di genotipizzazione attesi. Sono state riscontrate solo differenze trascurabili nell'intensità di colorazione delle Teststrips e non è stata osservata alcuna colorazione di fondo. FMF StripAssay® è stato convalidato su AB GeneAmp® PCR System 2700, AB GeneAmp® PCR System 9700, AB Veriti e MJ Research PTC-200, che presentano velocità di riscaldamento e raffreddamento rispettivamente nell'intervallo da 1,7 a 4,2°C/s e da 1,4 a 3,7°C/s.

L'utilizzo di altri termociclatori deve essere verificato dall'utente.

La **specificità analitica** è garantita innanzitutto dalla selezione dei primer specifici per il gene e delle sonde di cattura specifiche per allele, nonché dalla selezione di condizioni di reazione stringenti. I primer e le sonde sono stati controllati per verificare possibili omologie con tutte le sequenze pubblicate nei database genetici, mediante l'analisi di confronto delle sequenze. In questo modo, è stata assicurata la rivelabilità di tutti i genotipi pertinenti. La potenziale reattività crociata tra le sonde di cattura è stata verificata con DNA sintetico recante il rispettivo frammento genico. Non è stata osservata reattività crociata.

**Prestazione clinica:** La valutazione della prestazione clinica degli FMF StripAssays® a sostegno delle evidenze cliniche ha comportato un esame sistematico dei dati disponibili e degli elementi applicabili. In seguito alla ricerca nella letteratura, sono state identificate 22 pubblicazioni relative alla sicurezza e alle prestazioni degli FMF StripAssays®, che dimostrano l'utilità clinica di FMF StripAssay®. Negli studi di confronto dei metodi non sono stati identificati eventi avversi o deviazioni. In sintesi, la prestazione clinica, i benefici e la sicurezza di FMF StripAssay® sono confermati quando il dispositivo è utilizzato come previsto per la diagnosi della febbre mediterranea familiare.

## IX. SOSTANZE INTERFERENTI

Sono state testate cinque sostanze interferenti (emoglobina, immunoglobulina G, tracce di sangue, etanolo ed EDTA) potenzialmente presenti nelle preparazioni di DNA derivate da sangue in EDTA. I loro effetti sulla PCR sono stati valutati in tre campioni di DNA purificato con diverse concentrazioni di sostanze e confrontati con i relativi controlli senza aggiunta di sostanze interferenti. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato.

Una concentrazione finale di emoglobina <10 µM, immunoglobulina G 0,1 µM, sangue periferico <1%, etanolo 1,25% o EDTA 0,1 mM nella reazione non ha interferito con le prestazioni di StripAssay®.

## X. LIMITI DEL TEST

FMF StripAssay® è concepito esclusivamente per la rilevazione di 12 mutazioni note, elencate nella sezione III, rappresentate dalle sonde di cattura specifiche per allele che si trovano sulle Teststrips. Non è possibile rilevare altre mutazioni di *MEFV* che potrebbero essere presenti nel campione di un paziente.

Varianti rare o private all'interno dei siti di legame dei primer e delle sonde possono determinare l'insuccesso dell'amplificazione e la mancanza di segnali sulle Teststrips.

Campioni di DNA ottenuti con metodi diversi rispetto ai reagenti e al protocollo forniti con FMF StripAssay® potrebbero in alcuni casi mostrare segnali deboli o assenti per wild type e mutante E148Q. L'effetto è dovuto alla riduzione dell'efficienza della PCR per questo particolare frammento ed è stato osservato con diversi kit comuni di estrazione del DNA. Preriscaldando tali campioni di DNA a 98°C per 10 minuti e raffreddandoli immediatamente su ghiaccio o in un blocco freddo prima di impostare la PCR, è possibile ripristinare completamente i normali rendimenti della PCR.

FMF StripAssay® è destinato esclusivamente all'uso professionale in laboratorio.

## XI. CONSIDERAZIONI SULLA QUALITÀ

- Per ottenere risultati affidabili, è necessaria una conoscenza approfondita della procedura qui descritta, nonché delle tecniche di laboratorio standard e delle attrezzature adeguate.
- Non utilizzare i kit StripAssay® oltre la data di scadenza.
- Dopo la prima apertura del contenitore primario, i reagenti di StripAssay® sono stabili fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta esterna del kit, se correttamente conservati tra 2°C e 8°C.
- Utilizzare puntali per pipette sterili monouso con filtri per evitare la contaminazione microbica e la contaminazione crociata dei reagenti o dei campioni. Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Solo per uso singolo.

## XII. SICUREZZA

- Non bere, mangiare, fumare o usare cosmetici nelle aree di lavoro designate. Durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit, indossare camici da laboratorio e guanti monouso. Successivamente, lavarsi accuratamente le mani.
- Maneggiare i campioni come potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi. Pulire e disinfettare accuratamente tutti i materiali e le superfici che sono stati a contatto con i campioni. Smaltire tutti i rifiuti associati ai campioni clinici in un contenitore per rifiuti a rischio biologico.
- Evitare che DNAT e Color Developer entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua. In caso di versamento, diluire con acqua prima di asciugare.
- Attenersi alle normative locali e nazionali vigenti in materia di sicurezza e ambiente.

### **XIII. ASSISTENZA TECNICA**

È possibile ottenere assistenza tecnica tramite:

- il distributore locale di ViennaLab Diagnostics ([www.viennalab.com/distribution](http://www.viennalab.com/distribution))
- i Video Tutorial ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- il manuale di StripAssay® ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- la Troubleshooting Guide di StripAssay® ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- rivolgendosi a [techhelp@viennalab.com](mailto:techhelp@viennalab.com)












### **XIV. BIBLIOGRAFIA**

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

### **XV. FEEDBACK AL FABBRICANTE**

Eventuali incidenti gravi verificatisi in relazione a StripAssay® devono essere segnalati all'autorità competente del Paese e al fabbricante.

**XVI. SIMBOLI**

	Numero di catalogo
	Codice lotto
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Conforme al Regolamento europeo 2017/746 sugli IVD
0123	Numero di identificazione dell'organismo notificato
	Sufficiente per <n> test
	Limiti di temperatura per la conservazione
	Data di scadenza
	Attenzione
	Fabbricante
	Data di fabbricazione
	Consultare le istruzioni per l'uso

XVII. ESEMPI DI RISULTATI DEI TEST

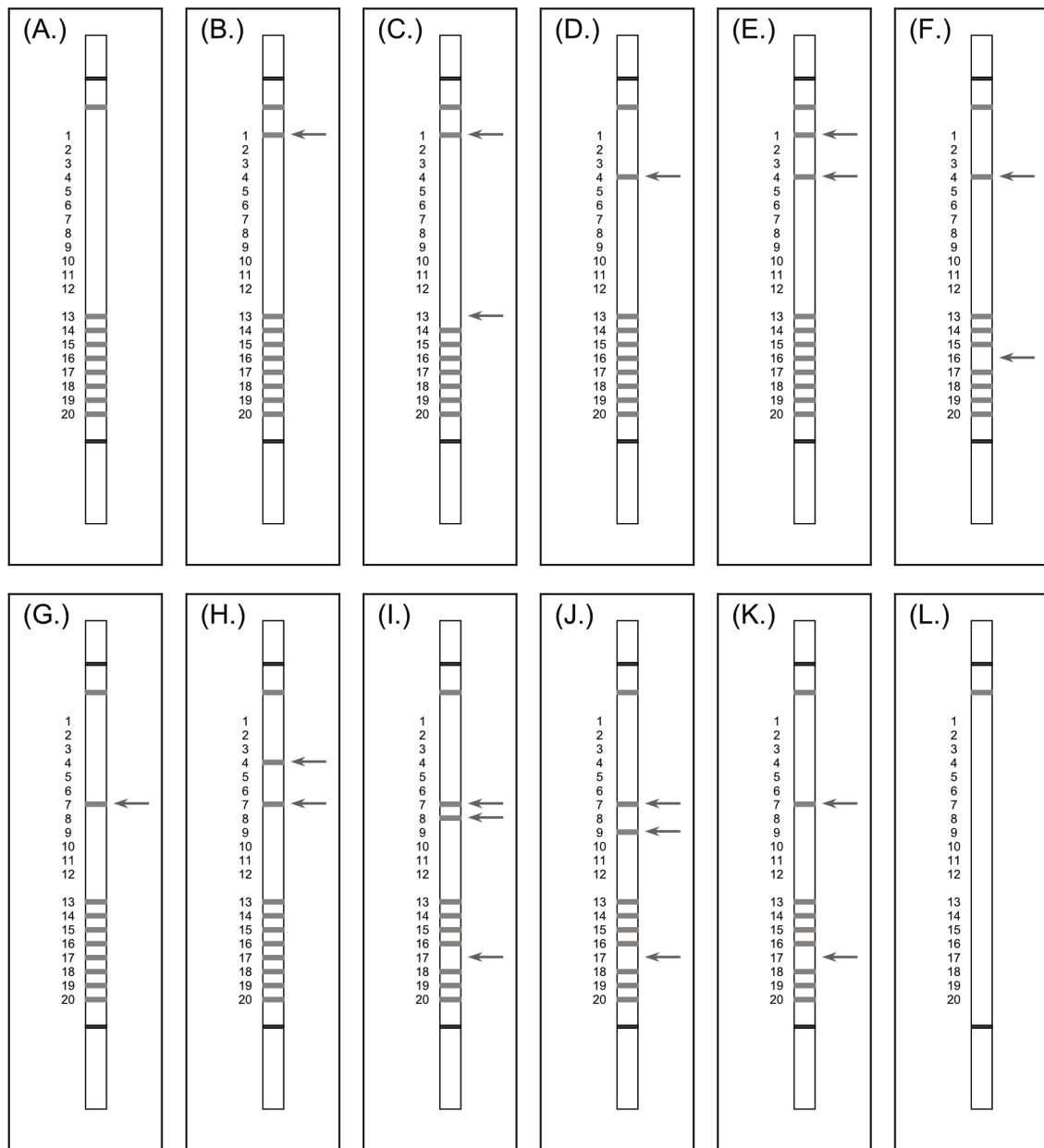



Fig. 3: Esempi di risultati ottenuti con FMF StripAssay®

- (A.) normale
- (B.) E148Q eterozigote
- (C.) E148Q omozigote
- (D.) M680I (G/C) eterozigote
- (E.) E148Q - M680I (G/C) eterozigote
- (F.) M680I (G/C) omozigote
- (G.) M694V eterozigote
- (H.) M680I (G/C) - M694V eterozigote
- (I.) M694V - M694I eterozigote
- (J.) M694V - K695R eterozigote
- (K.) M694V omozigote
- (L.) controllo negativo o PCR non riuscita

**NOTE**

## XVIII. PRODOTTI CORRELATI

<b>REF</b>		
4-230	FMF StripAssay®	20 test
4-390	FMF-SAA1 StripAssay®	20 test
CS-012	StripAssay® Detection Reagents	20 test
CS-017	StripAssay® Detection Reagents 48	48 test
2-014	GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System	100 estrazioni
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 estrazioni
6-080	Typing Trays	5

**Distributore:**



**Fabbricante:**



**ViennaLab Diagnostics GmbH**

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

t: +43 1 8120156-0

e: [info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

w: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)