

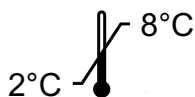
FMF StripAssay[®]

Instrukcja używania

REF



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



Wersja: wer. 1.0 / polski
Elektroniczna instrukcja używania i inne
wersje językowe są dostępne na stronie
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

SPIS TREŚCI

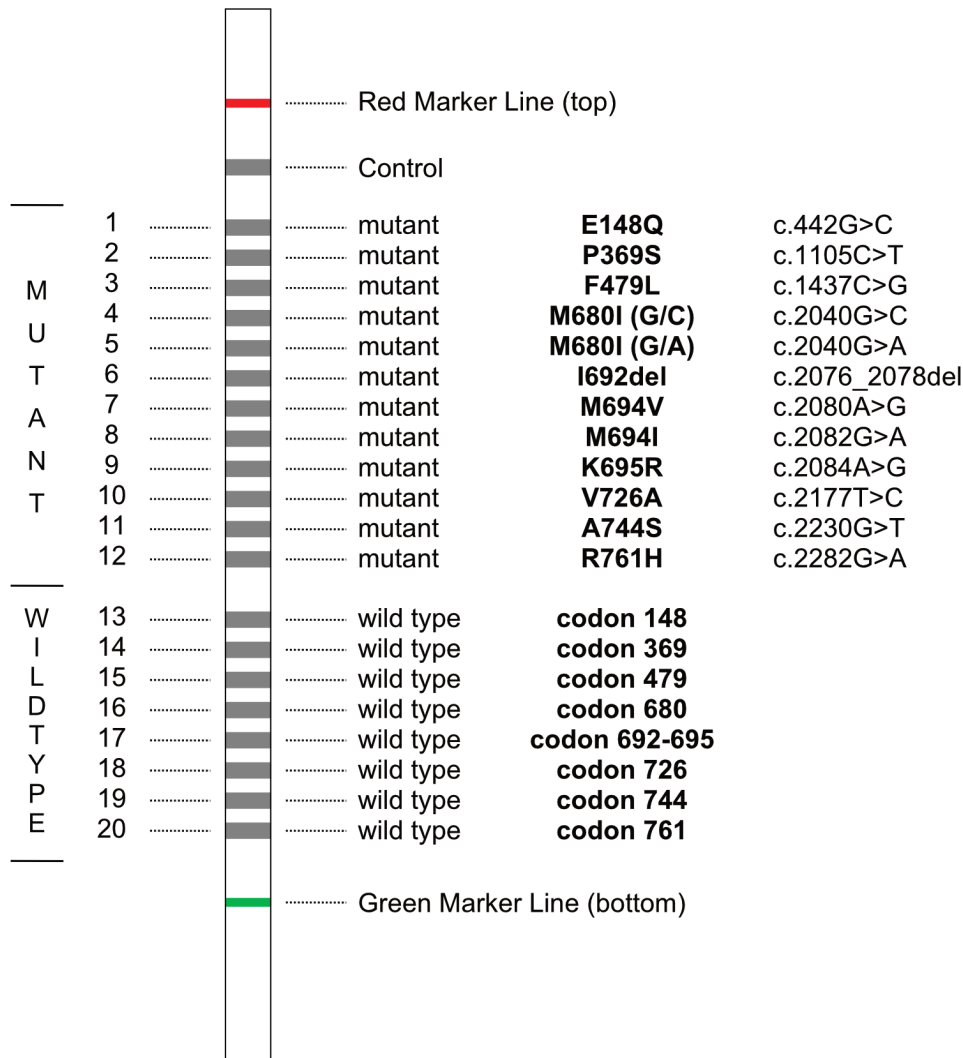
I.	PRZEZNACZENIE	4
II.	INFORMACJE PODSTAWOWE	4
III.	METODOLOGIA.....	4
IV.	ELEMENTY ZESTAWU	6
V.	MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIE DOSTARCZANE.....	7
VI.	PROCEDURA TESTU.....	8
VII.	INTERPRETACJA WYNIKÓW	12
VIII.	OCENA SKUTECZNOŚCI	14
IX.	SUBSTANCJE ZAKŁÓCAJĄCE.....	14
X.	OGRANICZENIA TESTU	15
XI.	KWESTIE DOTYCZĄCE JAKOŚCI.....	15
XII.	BEZPIECZEŃSTWO	15
XIII.	POMOC TECHNICZNA.....	16
XIV.	BIBLIOGRAFIA	16
XV.	INFORMACJE DLA PRODUCENTA.....	16
XVI.	SYMBOLE	17
XVII.	PRZYKŁADY WYNIKÓW TESTU	18
XVIII.	PRODUKTY POWIĄZANE	20

HISTORIA ZMIAN:

wersja	data	opis
wersja 1.0	2022-11	Dodanie treści związanych z IVDR do wersji 2022-01.

Podsumowanie bezpieczeństwa i skuteczności (SSP, Summary of Safety and Performance) testu StripAssay® można znaleźć w europejskiej bazie danych o wyrobach medycznych (EUDAMED):

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed> lub uzyskać od producenta.



EN	PL
mutant	mutant
wildtype	typ dziki
control	kontrola
red marker line (top)	czerwona linia znacznika (na górze)
green marker line (bottom)	zielona linia znacznika (na dole)

Rys. 1: Budowa Teststrip

Uwaga: Teststrip nie są narysowane w rzeczywistych rozmiarach i nie wolno ich używać do interpretacji wyników!

I. PRZEZNACZENIE

FMF StripAssay® to jakościowy test genetyczny przeznaczony do celowanej analizy 12 częstych mutacji w genie *MEFV* powiązanych z rodzinną gorączką śródziemnomorską (FMF, Familial Mediterranean Fever). Do badań wykorzystuje się genomowy DNA wyekstrahowany z próbek pełnej krwi obwodowej. FMF StripAssay® jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w diagnostyce FMF u pacjentów z objawami klinicznymi zgodnymi z FMF lub u krewnych pacjenta z grupy ryzyka, u których zidentyfikowano patogenną mutację *MEFV*. Test StripAssay® można przeprowadzić ręcznie lub półautomatycznie.

Do stosowania w diagnostyce *in vitro* u ludzi.

II. INFORMACJE PODSTAWOWE

Rodzinna gorączka śródziemnomorska jest najczęstszą monogenową chorobą autozapalną, która charakteryzuje się nawracającymi epizodami gorączki z towarzyszącym bólem brzucha (zapalenie otrzewnej), klatki piersiowej (zapalenie opłucnej) lub stawów (zapalenie stawów) oraz rumieniem przypominającym różę. Wiadomo, że ustrojowa reaktywna (AA) amyloidoza jest głównym długotrwałym powikłaniem o ciężkich objawach i złym rokowaniu. W większości przypadków FMF jest dziedziczona w sposób autosomalny recesywny i obserwuje się ją przede wszystkim u pacjentów z populacji śródziemnomorskiej i bliskowschodniej. Liczne warianty gorączki śródziemnomorskiej (*MEFV*) opisano jako ubytki molekularne powodujące FMF. Sam gen *MEFV* jest zlokalizowany na chromosomie 16p13.3 i składa się z 10 eksonów, które kodują białko o długości 781 aminokwasów, znane jako piryna. Kliniczna reprezentacja FMF może być złożona, w związku z czym badania genetyczne w kierunku mutacji *MEFV* są realnym sposobem potwierdzenia rozpoznania.

III. METODOLOGIA

Test FMF StripAssay® opiera się na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, polymerase chain reaction) i odwrotnej hybrydyzacji. Ta procedura obejmuje trzy etapy: (1) izolacja DNA, (2) amplifikacja PCR z użyciem biotynylowanych starterów, (3) hybrydyzacja produktów amplifikacji z Teststrip zawierającym swoiste względem alleli sondy oligonukleotydydowe unieruchomione w postaci układu równoległych linii (Rys. 1). Związane biotynylowane sekwencje są wykrywane za pomocą koniugatu fosfatazy alkalicznej ze streptawidyną i barwnych substratów.

Test FMF StripAssay® wykrywa następujące mutacje w locus genu *MEFV*:

	Nazwa przestarzała	Nomenklatura 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

Sekwencja referencyjna (RefSeq, Reference Sequence):



NM_000243.2

NG_007871.1

Ten test można przeprowadzić ręcznie lub półautomatycznie za pomocą instrumentów przeznaczonych do automatyzacji przetwarzania Teststrip (patrz punkt VI. 3.4).

IV. ELEMENTY ZESTAWU

REF

	4-230	4-230-A	4-230 -TRIAL
1. Lysis Solution	50 ml	---	50 ml
2. Żywica GEN^XTRACT™	5 ml	---	5 ml
3. Amplification Mix (<i>żółta nasadka</i>)	500 µl	2 x 500 µl	500 µl
4. Taq Dilution Buffer Taq (<i>przezroczysta nasadka</i>)	500 µl	500 µl	500 µl
5. Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (<i>czerwona nasadka</i>)	75 U	125 U	75 U
6. DNAT (<i>niebieska nasadka</i>)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Ostrzeżenie: DNAT zawiera 1,6% NaOH H315: Działa drażniąco na skórę H319: Działa drażniąco na oczy P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy P337 + P313: W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza</p>			
7. Typing Trays	3	---	1
8. Teststrip	20	2 x 24	5
9. Hybridization Buffer (<i>biała nasadka</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
10. Wash Solution A (<i>biała nasadka</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
11. Conjugate Solution (<i>przezroczysta nasadka</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
12. Wash Solution B (<i>przezroczysta nasadka</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
13. Color Developer (<i>brązowa nasadka</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Ostrzeżenie: Color Developer zawiera ≤0,4% kwasu maleinowego H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy P302 + P352: W przypadku kontaktu ze skórą: umyć dużą ilością wody P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza</p>			
14. Instrukcja używania	1	1	1
15. Collector™ Sheet	1	3	1

Uwaga: Wszystkie odczynniki, gdy nie są używane, należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C!

Nazwa komponentu	Skład
Lysis Solution	Roztwór hipotoniczny zawierający KHCO ₃ , NH ₄ Cl, EDTA
Żywica GEN ^X TRACT™	Żywica Chelex 100 Resin MB w roztworze buforowanym
Amplification Mix	Swoiste względem sekwencji oligonukleotydy znakowane 5'-biotyną, równomolowa mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dATP, dCTP, dGTP i dTTP), bufor siarczanu amonu, glicerol, 0,05% azydek sodu
Taq Dilution Buffer	bufor do Taq DNA Polymerase, w tym (NH ₄) ₂ SO ₄ i MgCl ₂ , 0,05% azydek sodu
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	polimeraza DNA taq w stężeniu 5 U/µl
DNAT	Roztwór zasadowy zawierający 1,6% wodorotlenku sodu i niebieski barwnik wskazujący zmianę pH
Typing Trays	plastikowy pojemnik z ośmioma studzienkami

Nazwa komponentu	Skład
Teststrip	Swoiste względem allelu sondy oligonukleotydowe i kontrola hybrydyzacji unieruchomiona w postaci układu równoległych linii na membranie na podłożu poliestrowym, otoczonego czerwoną linią na górze i zieloną linią na dole
Hybridization Buffer	Bufor fosforanowy z dodatkiem <2% detergentu
Wash Solution A	Bufor cytrynianowy z dodatkiem <1% detergentu
Conjugate Solution	Fosfataza alkaliczna skoniugowana ze streptawidyną rozcieńczona w buforze na bazie soli fizjologicznej z 0,05% azydkiem sodu
Wash Solution B	Bufor Tris zawierający <2% detergentu i 0,05% azydku sodu
Color Developer	Barwny substrat dla fosfatazy alkalicznej zawierający błękit nitrotetrazolowy (NBT, nitro blue tetrazolium) i fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indolilu (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
Instrukcja używania	drukowana wersja papierowa
Collector™ Sheet	drukowana wersja papierowa

V. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIE DOSTARCZANE

Poza standardowym sprzętem laboratoryjnym stosowanym w laboratorium biologii molekularnej, potrzebne są:

- Termoblok lub termomikser do probówek reakcyjnych 1,5 ml z regulacją temperatury do 99°C
- Regulowana mikrowirówka o prędkości 3000–12 000 obr./min (1000–12 000 x g)
- Termocykler z podgrzewaną pokrywą (specyfikacja szybkości narastania, patrz punkt VIII)
- Łaźnia wodna z platformą wytrząsającą, pokrywą i regulowaną temperaturą (45°C ± 1°C)
- Wytrząsarka (wytrząsarka kołyskowa lub orbitalna)

Opcjonalnie:

- Ssak próżniowy
- Termowytrząsarka do płytek mikrotitracyjnych z pokrywą i regulowaną temperaturą (45°C ± 1°C), np.: PST-60 HL (Biosan) lub urządzenie równoważne
- Instrument do automatycznej hybrydyzacji, regulowany do profilu czasu-temperatury, jak opisano w punkcie VI. 3.4, np. DYNABLOT Heat (Dynex) lub urządzenie równoważne
- Wyposażenie do elektroforezy w żelu agarozowym (do kontroli produktów amplifikacji)

VI. PROCEDURA TESTU

1. Przygotowanie próbki

Próbka: Należy użyć świeżej lub mrożonej krwi pobranej na antykoagulant EDTA. Nie badano krwi pobranej na heparynę lub cytrynian. Nie przechowywać krwi dłużej niż 3 dni w temperaturze otoczenia lub dłużej niż 1 tydzień w temperaturze od 2°C do 8°C przed użyciem. Nie należy używać krwi, która była przechowywana jako zamrożona przez ponad rok lub która została poddana więcej niż trzem cyklom zamrażania i rozmrażania. Podczas pobierania i transportu próbek należy postępować zgodnie z instrukcją używania probówki do pobierania krwi z EDTA oraz ogólnymi zaleceniami dotyczącymi pobierania krwi.

Ekstrakcja DNA: Doprowadzić próbki krwi do temperatury pokojowej. Dobrze wymieszać, kilkakrotnie ostrożnie odwracając probówkę do pobierania krwi. Odczekać, aż Lysis Solution i żywica GEN^XTRACT™ osiągną temperaturę pokojową.

- Odpipetować **100 µl próbki krwi** do mikroprobówki 1,5 ml z zakrętką.
- Dodać **1 ml Lysis Solution**, zamknąć probówkę i wymieszać, kilkakrotnie odwracając.
- Odstawić na **15 min** w temperaturze pokojowej.
- Odwirować w mikrowirówce przez **5 min** z prędkością **3000 obr./min** (ok. 1000 x g).
- Usunąć i wyrzucić górny 1 ml supernatantu.
- Dodać **1 ml Lysis Solution**, zamknąć probówkę i wymieszać, kilkakrotnie odwracając.
- Odwirować w mikrowirówce przez **5 min** z prędkością **12000 obr./min** (ok. 12000 x g).
- Usunąć i odrzucić supernatant z wyjątkiem ok. 50 µl widocznego, miękkiego osadu.
- Ponownie wprowadzić żywicę GEN^XTRACT™ do zawiesiny, dokładnie mieszając zawartość butelki.
- Dodać do osadu **200 µl żywicy GEN^XTRACT™**. Zamknąć probówkę i odwirować przez 10 sekund.

Uwaga: Żywica GEN^XTRACT™ szybko ulega sedymentacji. Powtórzyć ponowne wprowadzenie do zawiesiny za każdym razem bezpośrednio przed pobraniem kolejnej porcji.

- Inkubować przez **20 min** w temperaturze **56°C**. Zworteksować przez 10 sekund.
- Inkubować przez **10 min** w temperaturze **98°C**. Zworteksować przez 10 sekund.
- Odwirować w mikrowirówce przez **5 min** z prędkością **12 000 obr./min**. Schłodzić na lodzie.

Powstały supernatant zawiera matrycę DNA odpowiednią do natychmiastowego użycia w PCR. W celu dalszego przechowywania supernatant należy przenieść do świeżej probówki i przechowywać w lodówce (od 2°C do 8°C; do jednego tygodnia) lub zamrozić w temperaturze od -30°C do -15°C (przez dłuższy okres).

Stosowanie innych metod izolacji DNA w przypadku testu FMF StripAssay® nie zostało zatwierdzone. W przypadku stosowania innych systemów ekstrakcji DNA stężenie i czystość DNA powinny mieścić się w zakresie od 2 do 10 ng/µl, a stosunek OD_{A260/280} wynosić, odpowiednio, od 1,7 do 2,0. Wyższe stężenia DNA należy rozcieńczyć do zalecanego zakresu przed wprowadzeniem do PCR.

2. Amplifikacja in vitro (PCR)

Ważne: Wszystkie odczynniki do PCR i szablony DNA należy przez cały czas przechowywać w lodówce.

- Za każdym razem przygotować świeżą, odpowiednią ilość roztworu roboczego (1:25, końcowe stężenie 0,2 U/μl) **Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, czerwona nasadka) w **Taq Dilution Buffer** (przezroczysta nasadka) dla liczby próbek do analizy oraz **kontroli bez matrycy** (NTC, no-template control).

Składnik	na reakcję	np. 10 reakcji
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,2 μl	2 μl
Taq Dilution Buffer	4,8 μl	48 μl
Roztwór roboczy	5 μl	50 μl

- Przygotować jedną probówkę reakcyjną dla każdej próbki, która ma zostać poddana amplifikacji. Umieścić probówki na lodzie.
- Dla każdej próbki przygotować końcową mieszaninę reakcyjną PCR na lodzie:
 - 15 μl Amplification Mix** (żółta nasadka)
 - 5 μl rozcieńczonej Taq DNA Polymerase** (1U)
 - 5 μl matrycy DNA**

Uwaga: Zaleca się przygotowanie mieszaniny Master Mix dla wszystkich próbek zawierających Amplification Mix i rozcieńczoną Taq DNA Polymerase. Najpierw odpipetować 20 μl mieszaniny Master Mix do każdej probówki PCR, a następnie dodać matrycę DNA. Do każdej analizy należy dołączyć kontrolę bez matrycy, używając wody do PCR zamiast DNA (lub najlepiej ujemnej kontroli ekstrakcji DNA).

Ogólnie rzecz biorąc, należy przygotować roztwory robocze/mieszaninę master Mix z 10% nadwyżką objętości, aby skompensować niedokładności pipetowania.

- Szczelnie zakręcić probówki. Rozgrzać termocykler do 94°C.
- Włożyć probówki reakcyjne i uruchomić następujący program termocyklera:

Przed PCR: 94°C/2 min
Termocykling: 94°C/15 s – 58°C/30 s – 72°C/30 s (35 cykli)
Elongacja końcowa: 72°C/3 min

- Produkty amplifikacji przechowywać na lodzie lub w temperaturze od 2°C do 8°C do dalszego wykorzystania.

Opcjonalnie: Przeprowadzić analizę produktów amplifikacji metodą elektroforezy żelowej (np. 3% żel agarozowy).

Długości fragmentów: 206, 236, 295, 318 pz

3. Przetwarzanie Teststrip

3.1. Hybrydyzacja (ręczna) – 1 Teststrip na próbkę (45°C, łaźnia wodna z wytrząsaniem)

Ważne: Ustawić poziom wody w łaźni wodnej na ok. ½ wysokości Typing Tray. Podgrzać łaźnię wodną do dokładnie 45°C. Sprawdzić temperaturę wody za pomocą skalibrowanego termometru. Podgrzać Hybridization Buffer i Wash Solution A do temperatury 45°C. Należy uważać, aby wszystkie osady powstałe w temperaturze od 2°C do 8°C uległy całkowitemu rozpuszczeniu. Pozostawić Teststrip, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B i Color Developer do osiągnięcia temperatury pokojowej. Przygotować Typing Trays.

Za pomocą czystej pęsety wyjąć jeden Teststrip dla każdej próbki. Dotykać Teststrip wyłącznie w rękawiczkach bezpudrowych! Oznaczyć Teststrip poza liniami znacznika za pomocą ołówka (nie używać długopisów, markerów itp.).

- Odpipetować **10 µl DNAT** (niebieska nasadka) do dolnego rogu każdej ścieżki, która ma zostać użyta w Typing Trays (jedna ścieżka na próbkę).
- Dodać **10 µl produktu amplifikacji** do odpowiedniej kropli DNAT.
- Dokładnie wymieszać za pomocą pipety. (Roztwór pozostanie niebieski.)
- Odstawić na **5 min** w temperaturze pokojowej.
- Do każdej ścieżki dodać **1 ml Hybridization Buffer** (podgrzanego do 45°C). Delikatnie potrząsnąć pojemnikiem. (Niebieski kolor zniknie.)
- Włożyć **Teststrip** oznaczoną stroną do góry (linie widoczne!) w odpowiednie ścieżki. Należy je w całości zanurzyć.
- Inkubować przez **30 min** w temperaturze **45°C** na platformie wytrząsającej łaźni wodnej.

Ustawić umiarkowaną częstotliwość wytrząsania (ok. 50 obr./min), aby uniknąć rozlania. Pokrywa łaźni wodnej powinna być zamknięta, aby uniknąć wahań temperatury.

- Pod koniec inkubacji usunąć roztwory hybrydyzacyjne za pomocą aspiracji próżniowej lub pipetowania.

Natychmiast kontynuować procedurę. Nie dopuścić do wyschnięcia Teststrip podczas całej procedury.

3.2. Precyzyjne płukanie (45°C, łaźnia wodna z wytrząsaniem)

- Dodać **1 ml Wash Solution A** (podgrzanego do 45°C). Krótco przepłukać (10 s). Usunąć ciecz za pomocą aspiracji próżniowej lub pipetowania.
- Dodać **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubować przez **15 min** w temperaturze **45°C** w łaźni wodnej z wytrząsaniem. Usunąć ciecz za pomocą aspiracji próżniowej lub pipetowania.
- Dodać **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubować przez **15 min** w temperaturze **45°C** w łaźni wodnej z wytrząsaniem. Usunąć ciecz za pomocą aspiracji próżniowej lub pipetowania.

3.3. Detekcja metodą kolorymetryczną (temperatura pokojowa, 22°C ± 3°C)

- Dodać **1 ml Conjugate Solution**.
- Inkubować przez **15 min w temperaturze pokojowej** na wytrząsarce kołyskowej lub orbitalnej.
Usunąć ciecz za pomocą aspiracji próżniowej lub pipetowania.
- Dodać **1 ml Wash Solution B**. Krótko przepłukać (10 s).
Usunąć ciecz za pomocą aspiracji próżniowej lub pipetowania.
- Dodać **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubować przez **5 min w temperaturze pokojowej** na wytrząsarce kołyskowej lub orbitalnej.
Usunąć ciecz za pomocą aspiracji próżniowej lub pipetowania.
- Dodać **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubować przez **5 min w temperaturze pokojowej** na wytrząsarce kołyskowej lub orbitalnej.
Usunąć ciecz za pomocą aspiracji próżniowej lub pipetowania.
- Dodać **1 ml Color Developer**.
- Inkubować przez **15 min w temperaturze pokojowej w ciemności** na wytrząsarce kołyskowej lub orbitalnej.
Po wystąpieniu pozytywnej reakcji pojawi się fioletowe zabarwienie.
- Kilukrotnie przepłukać Teststrip wodą destylowaną.
Pozostawić paski do wyschnięcia w ciemności na bibule.

Po wywołaniu koloru nie wolno wystawiać Teststrip na działanie intensywnego światła.

3.4. Hybrydyzacja (automatyczna) – opcjonalna zamiast łaźni wodnej i wytrząsarki

Instrument do automatycznego przetwarzania Teststrip musi spełniać następujące wymagania:

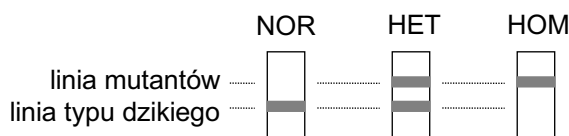
- Przeznaczony do programowania profil temperatury i czasu zgodnie z punktami od 3.1 do 3.3 procedury testu StripAssay®.
- Zintegrowana stacja podgrzewania Hybridization Buffer i Wash Solution A.
- Kontrola temperatury pojemników podczas etapów hybrydyzacji i precyzyjnego płukania w temperaturze 45°C ± 1°C.
- Aktywny system chłodzenia pojemnika zapewniający szybkie obniżenie temperatury na etapach wykrywania metodą kolorymetryczną w temperaturze pokojowej.
- Możliwość wytrząsania pojemnika.
- Podgrzewana pokrywa pojemnika zapobiegająca parowaniu odczynników podczas inkubacji.
- Dozowanie określonych objętości odczynników.
- Aspiracja odczynników.
- W zależności od używanego instrumentu i liczby próbek przetwarzanych w jednym cyklu mogą być wymagane dodatkowe odczynniki. Oddzielne StripAssay® Detection Reagents są dostępne na 20 testów (REF CS-012) i 48 testów (REF CS-017).

VII. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Genotyp próbki jest określany za pomocą dołączonej Collector™ Sheet. Przetworzony Teststrip należy umieścić w jednym z wyznaczonych pól, dopasować go do schematu za pomocą czerwonej linii znacznika (na górze) i zielonej linii znacznika (na dole) i unieruchomić taśmą klejącą.

Dodatnia reakcja najwyższej linii kontrolnej wskazuje na prawidłowe działanie Conjugate Solution i Color Developer. Linia ta powinna zawsze wybarwiać się dodatnio.

Dla każdej pozycji polimorficznej należy uzyskać jeden z następujących wzorów wybarwienia (Rys. 2):



Rys. 2: Genotypy – wzory wybarwienia na Teststrip

	linia typu dzikiego	linia mutantów	genotyp
NOR	dodatni	ujemny	normalny
HET	dodatni	dodatni	heterozygotyczny
HOM	ujemny	dodatni	homozygotyczny mutant

Uwaga: Intensywność zabarwienia linii dodatnich może być zmienna. Nie ma to żadnego znaczenia dla wyniku.

Patrz przykłady wyników testu StripAssay® na stronie 18 (Rys. 3).

Niektóre mutacje ujęte w teście FMF StripAssay® są zlokalizowane w niewielkiej liczbie nukleotydów genu *MEFV*. Na Teststrip są one reprezentowane przez zwykłą sondę typu dzikiego, tak więc 12 mutacji jest objętych tylko 8 sondami typu dzikiego:

linia	sonda typu dzikiego	mutacja
13	kodon 148	E148Q
14	kodon 369	P369S
15	kodon 479	F479L
16	kodon 680	M680I (G/C), M680I (G/A)
17	kodon 692-695	I692del, M694V, M694I, K695R
18	kodon 726	V726A
19	kodon 744	A744S
20	kodon 761	R761H

Próbki złożone heterozygotyczne pod względem dwóch z tych mutacji (np. M694V+ M694I, M694V + K695R) nie będą dawać częstego sygnału typu dzikiego (patrz przykłady I oraz J, strona 18).

Podobnie jak w przypadku każdego testu diagnostycznego, wyniki testu FMF StripAssay® należy interpretować w kontekście ogólnego fenotypu klinicznego pacjenta oraz innych medycznych badań diagnostycznych dostępnych dla lekarza. Firma ViennaLab Diagnostics GmbH nie ponosi odpowiedzialności za podejmowane decyzje kliniczne.

VIII. OCENA SKUTECZNOŚCI

Dokładność testu FMF StripAssay® została określona poprzez analizę 173 wstępnie typowanych próbek genomowego DNA. Wyniki były całkowicie zgodne z metodą referencyjną (sekwencjonowanie Sangera, elektroforeza w żelu w gradiencie denaturującym (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis) i polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, restriction fragment length polymorphism). Test prawidłowo wykrył 251 zmutowanych alleli (= 100% zgodności procentowej wyników dodatnich) i 103 alleli typu dzikiego (= 100% zgodności procentowej wyników ujemnych).

Precyzja testu FMF StripAssay® została oceniona jako zmienność między powtórzeniami, operatorami, dniami, partiami odczynników, termocyklerami i urządzeniami do hybrydyzacji (hybrydyzacja ręczna i półautomatyczna). Spośród łącznie 106 powtórzeń testów przeprowadzonych w ramach badanych parametrów wszystkie wykazały oczekiwane wyniki genotypowania. Widoczne były jedynie nieistotne różnice w intensywności wybarwienia Teststrip i nie zaobserwowano żadnego przypadku wybarwienia tła. Test FMF StripAssay® został zwalidowany na urządzeniach AB GeneAmp® PCR System 2700, AB GeneAmp® PCR System 9700, AB Veriti i MJ Research PTC-200, które charakteryzują się szybkością ogrzewania i chłodzenia w zakresie, odpowiednio, od 1,7 do 4,2°C/s i od 1,4 do 3,7°C/s.

Użycie innych termocyklorów musi zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Swoistość analityczna jest zapewniana przede wszystkim przez dobór starterów swoistych względem genu i sond wychwytyjących swoistych względem alleli, a także przez dobór rygorystycznych warunków reakcji. Startery i sondy zostały sprawdzone pod kątem możliwych homologii ze wszystkimi sekwencjami opublikowanymi w bazach danych genów, wykonując porównawczą analizę sekwencji. W ten sposób zapewniona została wykrywalność wszystkich odpowiednich genotypów. Potencjalna reaktywność krzyżowa między sondami wychwytyjącymi została sprawdzona za pomocą syntetycznego DNA zawierającego odpowiedni fragment genu. Nie zaobserwowano reaktywności krzyżowej.

Skuteczność kliniczna: Ocena skuteczności klinicznej testu FMF StripAssay® w celu uzasadnienia dowodów klinicznych obejmowała przegląd systematyczny dostępnych danych i odpowiednich elementów. W wyniku przeszukiwania literatury zidentyfikowano 22 publikacje dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności testu FMF StripAssay®, które wykazały użyteczność kliniczną testu FMF StripAssay®. W badaniach porównawczych metod nie zidentyfikowano żadnych zdarzeń niepożądanych ani odchyień. Podsumowując, skuteczność kliniczną, korzyści i bezpieczeństwo testu FMF StripAssay® są potwierdzone, kiedy wyrób jest używany zgodnie z przeznaczeniem do diagnostyki rodzinnej gorączki śródziemnomorskiej.

IX. SUBSTANCJE ZAKŁÓCAJĄCE

Zbadano pięć substancji zakłócających (hemoglobina, immunoglobina G, ślady krwi, etanol i EDTA), które mogą występować w preparatach DNA pochodzącego z krwi pobranej na EDTA. Ich wpływ na PCR oceniano w trzech oczyszczonych próbkach DNA wzbogaconych substancjami w różnym stężeniu i porównywano z kontrolami bez dodatku substancji zakłócających. Wszystkie próbki analizowano trzykrotnie.

Końcowe stężenie <10 µM hemoglobiny, 0,1 µM immunoglobuliny G, <1% krwi obwodowej, 1,25% etanolu lub 0,1 mM EDTA w reakcji nie zakłócało skuteczności testu StripAssay®.

X. OGRANICZENIA TESTU

Test FMF StripAssay® jest przeznaczony wyłącznie do wykrywania 12 znanych mutacji wymienionych w punkcie III, które są reprezentowane przez swoiste względem alleli sondy wychwytyjące znajdujące się na Teststrip. Nie można wykryć innych mutacji *MEFV*, które mogą występować w próbce pobranej od pacjenta.

Rzadkie lub prywatne warianty w obrębie miejsc wiązania starterów i sond mogą prowadzić do niepowodzenia amplifikacji i braku sygnałów na Teststrip.

Próbki DNA uzyskane metodami innymi niż z użyciem odczynników i protokołu dostarczonego z FMF StripAssay® mogą, w niektórych przypadkach, dawać słabe lub brakujące sygnały dla typu dzikiego i mutanta E148Q. Wynika to z pogorszenia skuteczności PCR dla tego konkretnego fragmentu i było obserwowane w przypadku kilku popularnych zestawów do ekstrakcji DNA. Podgrzewanie takich próbek DNA do 98°C przez 10 minut, a następnie natychmiastowe schładzanie w lodzie lub w zimnym bloku przed skonfigurowaniem PCR, może w pełni przywrócić normalną skuteczność PCR.

Test FMF StripAssay® jest przeznaczony wyłącznie do profesjonalnego użytku laboratoryjnego.

XI. KWESTIE DOTYCZĄCE JAKOŚCI

- Aby uzyskać wiarygodne wyniki, wymagane jest dokładne zrozumienie procedury opisanej w tym dokumencie oraz standardowych technik laboratoryjnych i odpowiedniego sprzętu.
- Zestawów StripAssay® nie należy używać po upływie terminu ważności.
- Po pierwszym otwarciu bezpośredniego pojemnika odczynniki StripAssay® zachowują stabilność do terminu ważności wydrukowanego na zewnętrznej etykiecie zestawu, jeśli są prawidłowo przechowywane w temperaturze od 2°C do 8°C.
- Aby uniknąć skażenia mikrobiologicznego oraz krzyżowego skażenia odczynników lub próbek, należy używać sterylnych jednorazowych końcówek do pipet z filtrami. Nie wymieniać zakrętek pomiędzy różnymi butelkami.
- Produkt jednorazowego użytku.

XII. BEZPIECZEŃSTWO

- W wyznaczonych miejscach pracy nie wolno pić, jeść, palić ani nakładać kosmetyków. W trakcie pracy z próbkami i odczynnikami z zestawu należy nosić fartuchy laboratoryjne i jednorazowe rękawiczki. Następnie należy dokładnie umyć ręce.
- Z próbkami należy postępować tak, jakby mogły przenosić czynniki zakaźne. Należy dokładnie oczyścić i zdezynfekować wszystkie materiały i powierzchnie, które miały kontakt z próbkami. Wszystkie odpady związane z próbkami klinicznymi należy wyrzucić do pojemnika na odpady stanowiące zagrożenie biologiczne.
- Unikać kontaktu DNAT i Color Developer ze skórą, oczami lub błonami śluzowymi. Jeśli doszło do takiego kontaktu, należy natychmiast przemyć zanieczyszczony obszar dużą ilością wody. W razie rozlania należy rozcieńczyć wyciek wodą, a następnie wytrzeć obszar do sucha.
- Należy przestrzegać wszystkich stosownych lokalnych i federalnych przepisów dotyczących bezpieczeństwa i ochrony środowiska.

XIII. POMOC TECHNICZNA

Pomoc techniczną można uzyskać:

- od lokalnego dystrybutora firmy ViennaLab Diagnostics (www.viennalab.com/distribution)
- w samouczkach wideo (www.viennalab.com/support)
- w podręczniku StripAssay® (www.viennalab.com/support)
- w przewodniku dotyczącym rozwiązywania problemów StripAssay® (www.viennalab.com/support)
- pisząc na adres techhelp@viennalab.com












XIV. BIBLIOGRAFIA

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

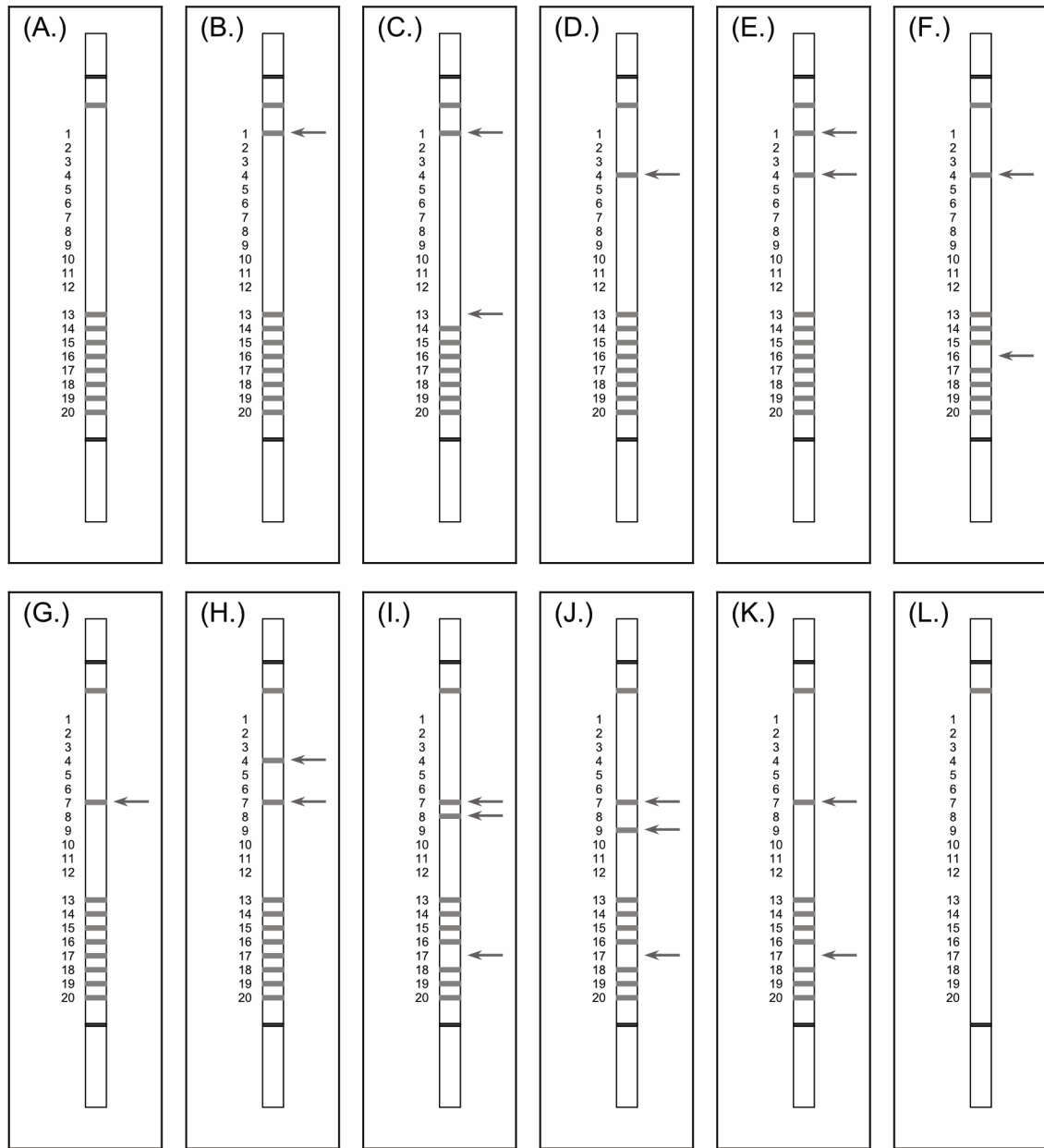
XV. INFORMACJE DLA PRODUCENTA

Każdy poważny incydent, który wystąpił w związku z testem StripAssay®, należy zgłosić właściwemu organowi w kraju i producentowi.

XVI. SYMBOLE

	Numer katalogowy
	Kod partii
	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Zgodność z europejskim rozporządzeniem IVD 2017/746
0123	Numer identyfikacyjny jednostki notyfikowanej
	Wystarcza na <n> testów
	Limity temperatury podczas przechowywania
	Termin ważności
	Przeostroga
	Producent
	Data produkcji
	Patrz instrukcja używania

XVII. PRZYKŁADY WYNIKÓW TESTU




Rys. 3: Przykłady wyników uzyskanych za pomocą testu FMF StripAssay®

- | | |
|---|--|
| (A.) normalny | (G.) M694V heterozygotyczny |
| (B.) E148Q heterozygotyczny | (H.) M680I (G/C) - M694V heterozygotyczny |
| (C.) E148Q homozygotyczny | (I.) M694V – M694I heterozygotyczny |
| (D.) M680I (G/C) heterozygotyczny | (J.) M694V – K695R heterozygotyczny |
| (E.) E148Q – M680I (G/C) heterozygotyczny | (K.) M694V homozygotyczny |
| (F.) M680I (G/C) homozygotyczny | (L.) kontrola ujemna lub niepowodzenie PCR |

UWAGI

XVIII. PRODUKTY POWIĄZANE

REF		
4-230	FMF StripAssay®	20 testów
4-390	FMF-SAA1 StripAssay®	20 testów
CS-012	StripAssay® Detection Reagents	20 testów
CS-017	StripAssay® Detection Reagents 48	48 testów
2-014	GEN ^X TRACT™ Blood DNA Extraction System	100 ekstrakcji
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 ekstrakcji
6-080	Typing Trays	5

Dystrybutor:



Producent:



ViennaLab Diagnostics GmbH

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

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com