

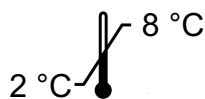
α -Globin StripAssay®

Gebrauchsanweisung

REF



| | |
|-------------|----------|
| 4-160 | 10 Tests |
| 4-160-A | 24 Tests |
| 4-160-TRIAL | 5 Tests |



IVD



Version: Rev 1.3 / Deutsch
eIFU und weitere Sprachen verfügbar auf
www.viennalab.com

CE 0123



ViennaLab Diagnostics GmbH

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

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZWECKBESTIMMUNG 4

II. HINTERGRUND 4

III. METHODEN 4

IV. KIT-BESTANDTEILE 6

V. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN 7

VI. DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS 8

VII. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE 12

VIII. LEISTUNGSBEWERTUNG 14

IX. STÖRSUBSTANZEN 14

X. GRENZEN DES ASSAYS 15

XI. QUALITÄTSÜBERLEGUNGEN 15

XII. SICHERHEIT 15

XIII. TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG 16

XIV. REFERENZEN 16

XV. RÜCKMELDUNG AN DEN HERSTELLER 16

XVI. SYMBOLE 17

XVII. BEISPIELE DER TESTERGEBNISSE 18

XVIII. VERWANDTE PRODUKTE 20

REVISIONSVERLAUF:

| Version | Datum | Beschreibung |
|----------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rev. 1.1 | 2022-02 | CE-Kennzeichen mit Identifikationsnummer der benannten Stelle, Links zur SSP-Erklärung der Probenquelle und manuelle/halbautomatische Verwendung (I), Spezifikation der Kit-Komponenten (IV); klinische Leistungsdaten (VIII) |
| Rev. 1.2 | 2022-05 | Ausstellungsdatum, Verweis auf elektronische IFU (eIFU), Iran (II) enthalten |
| Rev. 1.3 | 2022-11 | Layout und Auflösung der Abbildungen verbessert |

Ein Kurzbericht über Sicherheit und Leistung (SSP, Summary of Safety and Performance) des StripAssay® kann von der europäischen Datenbank für Medizinprodukte (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> abgerufen oder beim Hersteller angefordert werden.

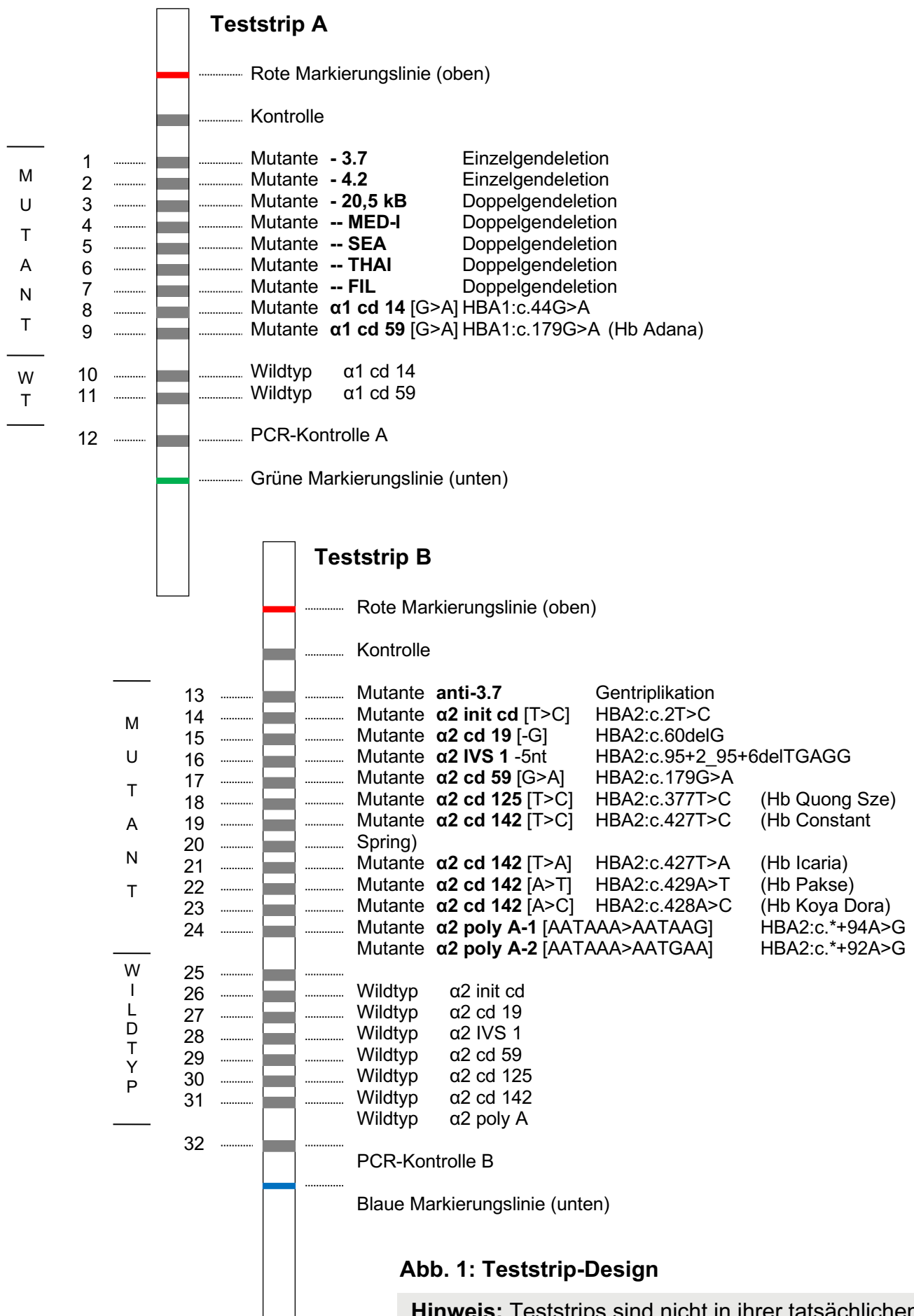


Abb. 1: Teststrip-Design

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

I. ZWECKBESTIMMUNG

Der α-Globin StripAssay® ist ein qualitativer Gentest für die zielgerichtete Analyse von 21 häufigen großen Deletionen und Punktmutationen der Gene der *Hämoglobin-Untereinheit Alpha 1 (HBA1, hemoglobin subunit alpha 1)* und *Alpha 2 (HBA2, hemoglobin subunit alpha 2)* in aus humanem peripherem Blut isolierter DNA. Der Test wird als Hilfe zur genetischen Bestätigung einer Verdachtsdiagnose von Alpha-Thalassämie (alpha-thal) verwendet. Außerdem kann der Assay für das Screening des Thalassämie-Trägerstatus bei Verwandten des Patienten und der allgemeinen Bevölkerung verwendet werden. Der StripAssay® kann entweder manuell oder halbautomatisch durchgeführt werden.

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

II. HINTERGRUND

Mutationen in den *Alpha-Globin*-Genen sind die genetische Ursache von Alpha-Thalassämie, einer autosomal-rezessiv vererbten Krankheit, die durch eine unzureichende oder fehlende Produktion der Alpha-Globin-Kette gekennzeichnet ist, was je nach Anzahl der betroffenen Allele zu einem unterschiedlichen klinischen Bild führt.

Patienten mit charakteristischen hämatologischen Werten der mikrozytären Anämie und entsprechenden Hämoglobinmustern, Familienmitglieder eines betroffenen Patienten, werdende Eltern sowie Personen aus Hochrisiko-Populationen (z. B. Mittelmeerregion, Afrika, arabische Halbinsel, Iran, Indien und Südostasien), bei denen die Gefahr besteht, dass sie Träger der Alpha-Thalassämie sind, sollten getestet werden.

III. METHODEN

Der α-Globin 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 α-Globin StripAssay® detektiert die folgenden Mutationen im *Alpha-Globin*-Genlocus:

| Alter Name | HGVS-Nomenklatur | RefSNP |
|------------------------------------|-----------------------------------|-------------|
| 1 -3,7 kb | NG_000006.1:g.34164_37967del3804 | -- |
| 2 -4,2 kb | n.a. | -- |
| 3 --20,5 kb | NG_000006.1:g.15164_37864del22701 | -- |
| 4 --MED-I | NG_000006.1:g.24664_41064del16401 | -- |
| 5 --SEA | NG_000006.1:g.26264_45564del19301 | -- |
| 6 --THAI | NG_000006.1:g.10664_44164del33501 | -- |
| 7 --FIL | NG_000006.1:g.11684_43534del31851 | -- |
| 8 anti-3.7 Gentrifikation | n.a. | -- |
| 9 cd 14 [G>A] | HBA1:c.44G>A | rs63750090 |
| 10 cd 59 [G>A] Hb Adana | HBA1:c.179G>A | rs28928878 |
| 11 initiation cd [T>C] | HBA2:c.2T>C | rs111033603 |
| 12 cd 19 [-G] | HBA2:c.60delG | rs886041399 |
| 13 IVS1-5nt | HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG | rs41474145 |
| 14 cd 59 [G>A] | HBA2:c.179G>A | rs281864846 |
| 15 cd 125 [T>C] Hb Quong Sze | HBA2:c.377T>C | rs41397847 |
| 16 cd 142 [T>C] Hb Constant Spring | HBA2:c.427T>C | rs41464951 |
| 17 cd 142 [T>A] Hb Icaria | HBA2:c.427T>A | rs41464951 |
| 18 cd 142 [A>T] Hb Pakse | HBA2:c.429A>T | rs41412046 |
| 19 cd 142 [A>C] Hb Koya Dora | HBA2:c.428A>C | rs41321345 |
| 20 polyA-1 [AATAAA>AATAAG] | HBA2:c.*+94A>G | rs63751269 |
| 21 polyA-2 [AATAAA>AATGAA] | HBA2:c.*+92A>G | rs63750067 |

Referenzsequenz (RefSeq, Reference Sequence):

NG_000006.1



NM_000558.3 (HBA1)

NM_000517.4 (HBA2)

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

IV. KIT-BESTANDTEILE

REF

| | 4-160 | 4-160-A | 4-160 -TRIAL |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|-------------------------|
| 1a. Amplification Mix A1 (gelber Verschluss) | 250 µl | 2 x 250 µl | 250 µl |
| 1b. Amplification Mix A2 (weißer Verschluss) | 250 µl | 2 x 250 µl | 250 µl |
| 1c. Amplification Mix B (grüner Verschluss) | 250 µl | 2 x 250 µl | 250 µl |
| 2. Taq Dilution Buffer (transparenter Verschluss) | 500 µl | 500 µl | 500 µl |
| 3. HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (roter Verschluss) | 125 U | 175 U | 125 U |
| 4. 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> | | | |
| 5. Typing Trays | 3 | --- | 2 |
| 6a. Teststrips A (schwarzer Verschluss) | 10 | 24 | 5 |
| 6b. Teststrips B (weißer Verschluss) | 10 | 24 | 5 |
| 7. Hybridization Buffer (weißer Verschluss) | 25 ml | 65 ml | 25 ml |
| 8. Wash Solution A (weißer Verschluss) | 80 ml | 200 ml | 80 ml |
| 9. Conjugate Solution (transparenter Verschluss) | 25 ml | 65 ml | 25 ml |
| 10. Wash Solution B (transparenter Verschluss) | 80 ml | 200 ml | 80 ml |
| 11. 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> | | | |
| 12. Gebrauchsanweisung | 1 | 1 | 1 |
| 13. Collector™ Sheet | 1 | 3 | 1 |

Hinweis: Reagenzien bei Nichtgebrauch bei 2 °C bis 8°C lagern!

| Name der Komponente | Zusammensetzung |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amplification Mix A1/A2/B | sequenzspezifische 5'-biotinmarkierte Oligonukleotide, eine äquimolare Mischung aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), MgCl ₂ , Ammoniumsulfatpuffer, Betain, 0,05 % Natriumazid |
| Taq Dilution Buffer | Puffer für HS-Taq DNA Polymerase, mit KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ und MgCl ₂ , 0,05 % Natriumazid |
| HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl) | Hot-Start-Taq DNA Polymerase mit einer Konzentration von 5 U/µl |
| 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 A/B | Allelspezifische Oligonukleotidsonden, Kontrolle für positive PCR-Reaktion und eine Hybridisierungskontrolle, immobilisiert als Anordnung paralleler Linien auf einer polyestergestützten Membran, begrenzt durch eine rote Linie oben (Teststrip A) und eine blaue Linie unten (Teststrip B) |
| Hybridization Buffer | Phosphatpuffer mit < 2 % Detergens |
| Wash Solution A | Phosphatpuffer mit < 1 % Detergens |
| Conjugate Solution | Streptavidin-alkalisches Phosphatase-Konjugat verdünnt in einem Puffer auf Kochsalzbasis mit 0,05 % Natriumazid |
| Wash Solution B | Tris-Puffer, der < 2 % Detergens und 0,05 % Natriumazid enthält |
| Color Developer | Farbsubstrat für die alkalische Phosphatase enthält Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT, nitro blue tetrazolium) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) |
| Gebrauchsanweisung | Papierausdruck |
| Collector™ Sheet | Papierausdruck |

V. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Neben der üblichen molekularbiologischen Laborausstattung ist Folgendes erforderlich:

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- Thermocycler mit beheiztem Deckel (Spezifikation der Heizraten siehe Abschnitt VIII)
- Wasserbad mit Schütteltisch, Deckel und einstellbarer Temperatur ($45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$)
- Schüttelapparat (Wippschüttler oder Orbitalschüttler)

Optional:

- Vakuumabsauggerät
- Thermoschüttler für Mikrotiterplattenformat mit Deckel und einstellbarer Temperatur ($45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), z. B. PST-60 HL (Biosan) oder gleichwertiges Gerät
- Gerät für die automatische Hybridisierung, einstellbar auf das Zeit-Temperatur-Profil wie in Abschnitt VI beschrieben. 3.4, z. B. DYNABLOT Heat (Dynex) oder gleichwertiges Gerät
- Ausstattung für die Agarose-Gelelektrophorese (für die Kontrolle der Amplifikationsprodukte)

VI. DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS

1. Probenvorbereitung

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. Mischen vor jeder Teilblutprobenentnahme wiederholen. Es wird empfohlen, das **Spin Micro DNA Extraction Kit** (REF 2-020, ViennaLab) für die DNA-Isolation aus Vollblut zu verwenden. Der Einsatz anderer DNA-Isolationsmethoden mit dem α -Globin 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/ μ l 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.

Hinweis: DNA, die PCR-Inhibitoren und/oder magnetische Partikel enthält, die aus bead-basierten Extraktionssystemen entnommen wurden, kann gegenüber einer Amplifikation refraktär sein und sollte mithilfe von PCR-geeignetem Wasser auf 2 ng/ μ l verdünnt werden.

Extrahierte DNA muss bei 2 °C bis 8 °C (bis zu eine Woche) oder bei -30 °C bis -15 °C (für längere Zeiträume) bis zur Durchführung der Analyse gelagert werden.

2. In Vitro-Amplifikation (PCR) – 3 getrennte Reaktionen pro Probe

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

- Jedes Mal eine geeignete Menge Arbeitslösung (1:15, Endkonz. 0,33 U/μl) aus **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, roter Verschluss) in **Taq Dilution Buffer** (transparenter Verschluss) für die zu analysierende Anzahl der Proben sowie die **No-template control (NTC)** vorbereiten.

| Komponente | pro Reaktion | z. B. 10 Reaktionen |
|--------------------------------|--------------|---------------------|
| HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl) | 0,33 μl | 3,3 μl |
| Taq Dilution Buffer | 4,67 μl | 46,7 μl |
| Arbeitslösung | 5 μl | 50 μl |

- Drei Reaktionsröhrchen für jede zu amplifizierende Probe vorbereiten. Die Röhrchen auf Eis legen.
- Für jede Probe 3 endgültige PCR-Reaktionsmischungen (A1, A2, B) auf Eis vorbereiten:
 - A1: **15 μl Amplification Mix A1** (gelber Verschluss)
5 μl verdünnte HS-Taq DNA Polymerase (1,66 U)
5 μl Ausgangs-DNA
 - A2: **15 μl Amplification Mix A2** (weißer Verschluss)
5 μl verdünnte HS-Taq DNA Polymerase (1,66 U)
5 μl Ausgangs-DNA
 - B: **15 μl Amplification Mix B** (grüner Verschluss)
5 μl verdünnte HS-Taq DNA Polymerase (1,66 U)
5 μl Ausgangs-DNA

Hinweis: Es wird empfohlen einen Mastermix für alle Proben vorzubereiten, der Amplification Mix und verdünnte HS-Taq DNA Polymerase enthält. Zuerst 20 μl des Mastermix in jedes PCR-Röhrchen pipettieren und dann Ausgangs-DNA zugeben. In jeden Lauf die No-template control durch Verwendung von PCR-geeignetem Wasser statt DNA (oder bevorzugt die negative Kontrolle Ihrer DNA-Extraktion) inkludieren.

Allgemein Arbeitslösung/Master Mix mit 10 % Exzessvolumen vorbereiten, um Pipettierungsungenauigkeiten auszugleichen.

- Röhrchen fest verschließen. Thermocycler auf 95 °C vorheizen.
- Reaktionsröhrchen einsetzen und das folgende Thermocycling-Programm ausführen:
 - prä-PCR: 95 °C/5 Min.**
 - Thermocycling: 97 °C/40 Sek. – 64 °C/40 Sek. – 72 °C/1:30 Min. (3 Zyklen)**
97 °C/40 Sek. – 58 °C/40 Sek. – 72 °C/1:30 Min. (37 Zyklen)
 - Finale Extension: 72 °C/5 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: 881 bp; Deletionen: 1783 bp (A1)
 296 bp; Deletionen: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 bp (A2)
 302, 864 bp; Deletionen: 1772 bp (B)

3. Bearbeitung der Teststrips

3.1. Hybridisierung (manuell) – 2 Teststrips pro Probe (45 °C, Wasserbadschüttler)

Wichtig: Wasserstand des Wasserbads ungefähr auf die halbe Höhe des Typing Trays einstellen. Wasserbad auf exakt 45 °C erhitzen. Wassertemperatur mit einem kalibrierten Thermometer prüfen. Hybridization Buffer und Wash Solution A auf 45 °C vorwärmen. Darauf achten, dass sich alle bei 2 °C bis 8 °C gebildeten Präzipitate vollständig aufgelöst haben. Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B und Color Developer auf Raumtemperatur bringen. Typing Tray(s) vorbereiten.

Einen Teststrip A und einen Teststrip B für jede Probe mit einer sauberen Pinzette entfernen. Teststrips nur mit puderfreien Handschuhen berühren! Teststrips außerhalb der Markierungslinien mit einem Bleistift beschriften (keine Kugelschreiber, Marker usw.).

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

- **20 µl DNAT** (blauer Verschluss) in die untere Ecke jeder Vertiefung, die in den Typing Trays verwendet werden soll, pipettieren.
- **10 µl Amplifikationsprodukt A1** in den entsprechenden Tropfen DNAT pipettieren.
- **10 µl Amplifikationsprodukt A2** in denselben Tropfen zugeben.
- Mit einer Pipette gründlich mischen. (Die Lösung bleibt blau.)

- **5 Min.** bei Raumtemperatur stehen lassen.
- **1 ml Hybridization Buffer** (vorgewärmt auf 45 °C) in jede Spur geben. Tray vorsichtig schütteln. (Die blaue Farbe verschwindet.)
- **Teststrip A** oder **Teststrip B** mit markierter Seite nach oben (Linien sichtbar!) in die jeweiligen Vertiefungen legen. Vollständig eintauchen.
- **30 Min.** bei **45 °C** auf dem Schütteltisch des Wasserbads inkubieren.

Mittlere Schüttelfrequenz (ca. 50 U/min) einstellen, um ein Verschütten zu vermeiden. Abdeckung des Wasserbads geschlossen halten, um Temperaturschwankungen zu vermeiden.

- Am Ende der Inkubation Hybridisierungslösung durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.

Umgehend fortfahren. Teststrips während des gesamten Verfahrens nicht austrocknen lassen.

3.2. Stringentes Waschen (45 °C, Wasserbadschüttler)

- **1 ml Wash Solution A** (vorgewärmt auf 45 °C) zugeben. Kurz spülen (10 Sek.). Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution A** (45 °C) zugeben.
- **15 Min.** bei **45 °C** im Wasserbadschüttler inkubieren.

- Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution A** (45 °C) zugeben.
 - **15 Min.** bei **45 °C** im Wasserbadschüttler inkubieren.
- Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.

3.3. Kolorimetrische Detektion (Raumtemperatur, 22 °C ± 3 °C)

- **1 ml Conjugate Solution** zugeben.
 - **15 Min.** bei **Raumtemperatur** auf einem Wippschüttler oder Orbitalschüttler inkubieren.
- Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution B** zugeben. Kurz spülen (10 Sek.).
- Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution B** zugeben.
 - **5 Min.** bei **Raumtemperatur** auf einem Wippschüttler oder Orbitalschüttler inkubieren.
- Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Wash Solution B** zugeben.
 - **5 Min.** bei **Raumtemperatur** auf einem Wippschüttler oder Orbitalschüttler inkubieren.
- Flüssigkeiten durch Vakuumabsaugung oder Pipettieren entfernen.
- **1 ml Color Developer** zugeben.
 - **15 Min.** bei **Raumtemperatur** im Dunkeln auf einem Wippschüttler oder Orbitalschüttler inkubieren.
- Bei positiver Reaktion erscheint eine violette Verfärbung.
- Teststrips mehrmals mit destilliertem Wasser waschen.
- Strips im Dunkeln auf absorbierendem Papier trocknen lassen.

Teststrips nach der Farbentwicklung keinem intensiven Licht aussetzen.

3.4. Hybridisierung (automatisch) – optional statt Wasserbad und Schüttelapparat

Ein Gerät für die automatische Verarbeitung von Teststrips muss die folgenden Anforderungen erfüllen:

- Programmierbares Temperatur- und Zeitprofil gemäß Abschnitt 3.1 bis 3.3 des StripAssay®-Verfahrens.
- Integrierte Vorheizstation für Hybridization Buffer und Wash Solution A.
- Temperaturkontrolle der Trays während der Hybridisierungs- und stringenten Waschschriffe bei 45 °C ± 1 °C.
- Aktives Kühlsystem für das Tray, um eine rasche Temperaturverringierung für kolorimetrische Detektionsschritte bei Raumtemperatur sicherzustellen.
- Schüttler für Tray.
- Beheizter Deckel für das Tray, um eine Verdunstung der Reagenzien während der Inkubation zu vermeiden.
- Abgabe definierter Reagenzienvolumen.
- Absaugung von Reagenzien.
- Abhängig vom verwendeten Gerät und von der Anzahl der in einem Lauf verarbeiteten Proben können zusätzliche Reagenzien erforderlich sein. Separate StripAssay® Detection Reagents sind für 20 Tests (REF CS-012) und 48 Tests (REF CS-017) erhältlich.

VII. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Der Genotyp der Probe wird von den entsprechenden Teststrips A und B mithilfe des beigefügten Collector™ Sheet bestimmt. Beide Teststrips in die gekennzeichneten Felder legen, mit der Schemazeichnung unter Verwendung der roten Markierungslinie (oben) und der grünen oder blauen Markierungslinie (unten) ausrichten und mit Klebeband fixieren.

Eine positive Reaktion der obersten Kontrolllinie gibt die korrekte Funktion der Conjugate Solution und des Color Developer an. Diese Linie sollte immer eine positive Verfärbung aufweisen.

Eine positive Reaktion der Linien der PCR-Kontrolle A und PCR-Kontrolle B weist auf das Vorhandensein korrekter Amplifikationsprodukte hin. Diese Linien müssen immer eine positive Verfärbung aufweisen, mit Ausnahme der No-template control, die Wasser statt Ausgangs-DNA enthält (siehe Beispiel H, Seite 18).

Das Nichtvorhandensein von PCR-Kontrollen auf Teststrips könnte auf eine falsche Hybridisierung von Mix A1/A2 Amplifikationsprodukten auf Teststrip B und Mix B Amplifikationsprodukten auf Teststrip A hinweisen. Test wiederholen.

Für jede polymorphe Position sollte eines der folgenden Verfärbungsmuster (Abb. 2) entstehen:

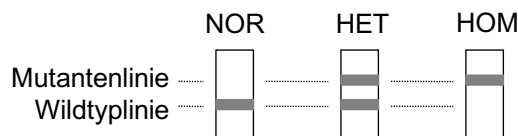


Abb. 2: Genotypen – Färbungsmuster auf Teststrip

| | 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 α-Globin StripAssay® abgedeckten Punktmutationen befinden sich innerhalb weniger Nukleotide auf dem α-Globin-Gen. Diese werden auf den Teststrips durch eine häufige Wildtypsonde dargestellt, sodass die 21 Mutationen durch nur 9 Wildtypsonden abgedeckt werden:

| Linie | Wildtypsonde | Mutation |
|-------|--------------|--------------------------------------------------|
| 10 | α1 cd 14 | α1 cd 14 [G>A] |
| 11 | α1 cd 59 | Hb Adana |
| 25 | α2 init cd | α2 init cd [T>C] |
| 26 | α2 cd 19 | α2 cd 19 [-G] |
| 27 | α2 IVS 1 | α2 IVS 1 -5nt |
| 28 | α2 cd 59 | α2 cd 59 [G>A] |
| 29 | α2 cd 125 | Hb Quong Sze |
| 30 | α2 cd 142 | Hb Constant Spring, Hb Icaria, Hb Pakse, Hb Koya |
| 31 | α2 poly A | α2 poly A-1, α2 poly A-2 |

Bei Proben, die gemischt heterozygot für diese Mutationen sind (z. B. Hb Constant Spring + Hb Pakse), fehlt in den meisten Fällen das jeweilige Wildtypsignal (siehe Beispiel E, Seite 18).

Bei Proben, die gemischt heterozygot für eine der α1/α2-Mutationen und eine Einzel- oder Doppelgendeletion sind, fehlt in den meisten Fällen das jeweilige Wildtypsignal (siehe Beispiel D, Seite 18).

Für Einzel- und Doppelgendeletionen unterscheiden mehrere Wildtypsonden zwischen dem heterozygoten und homozygoten Mutantenzustand (siehe Beispiele B und C, Seite 18):

| Deletion | heterozygot | homozygot mutiert |
|-----------|---------------------------|-----------------------------------------|
| - 3,7 | alle WT-Signale vorhanden | WT-Signale 25-31 nicht vorhanden |
| - 4,2 | alle WT-Signale vorhanden | WT-Signale 25-31 nicht vorhanden |
| - 20,5 kb | alle WT-Signale vorhanden | WT-Signale 10 und 25–31 nicht vorhanden |
| -- MED-I | alle WT-Signale vorhanden | alle WT-Signale nicht vorhanden |
| -- SEA | alle WT-Signale vorhanden | alle WT-Signale nicht vorhanden |
| -- THAI | alle WT-Signale vorhanden | alle WT-Signale nicht vorhanden |
| -- FIL | alle WT-Signale vorhanden | alle WT-Signale nicht vorhanden |

Wie bei jedem diagnostischen Test müssen die Ergebnisse des α-Globin 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.

VIII. LEISTUNGSBEWERTUNG

Die **Genauigkeit** des α-Globin StripAssay® wurde durch Analyse von 330 vortypisierten genomischen DNA-Proben bestimmt. Außer einer Probe entsprachen die Ergebnisse der Referenzmethode (Sanger-Sequenzierung, Gap-PCR, ARMS-PCR, Reverse Dot-Blot-Analyse, durch EQA erhaltene Proben). Eine heterozygote polyA-2-Probe, die aus einer seltenen Rekombination der 3'-Enden von *Alpha-2*- und *Alpha-Pseudo*-Genen erschien, wurde vom StripAssay® als falsch negativ (Wildtyp) typisiert. Der Assay detektierte 359 mutierte Allele (= 99,7 % positive prozentuale Übereinstimmung) und 300 Wildtyp-Allele (= 100 % negative prozentuale Übereinstimmung) korrekt.

Die **Präzision** des α-Globin StripAssay® wurde als Variabilität zwischen Replikaten, Anwendern, Tagen, Thermocyclern und Hybridisierungsgeräten beurteilt. Von insgesamt 62 Tests, die unter den untersuchten Parametern durchgeführt wurden, zeigten 61 die erwarteten Genotypisierungsergebnisse und eine Probe versagte aufgrund der Ungenauigkeit der Pipettierung der Ausgangs-DNA. Es waren lediglich vernachlässigbare Unterschiede in den Färbungsintensitäten der Teststrips sichtbar und es wurde keine Hintergrundfärbung beobachtet. Der α-Globin StripAssay® wurde am AB GeneAmp® PCR System 2700, MJ Research PTC-200 und Eppendorf Mastercycler X50s validiert, die eine Heiz- und Kühlrate im Bereich von 1,7 bis 6,3 °C/Sek. bzw. 1,4 bis 3,7 °C/Sek. aufweisen.

Die Verwendung anderer Thermocycler muss vom Anwender verifiziert werden.

Die **analytische Spezifität** wird vor allem durch Auswahl genspezifischer Primer und allelspezifischer Sonden sowie Auswahl stringenter Reaktionsbedingungen sichergestellt. Die Primer und Sonden wurden mittels Sequenzvergleichsanalyse auf mögliche Homologien mit allen in Gendatenbanken veröffentlichten Sequenzen geprüft. Dadurch wurde die Detektierbarkeit aller relevanten Genotypen sichergestellt. Eine potentielle Kreuzreaktivität zwischen Sonden wurde mit synthetischer DNA, die das jeweilige Genfragment enthält, verifiziert. Es wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet.

Klinische Leistung: In einer multizentrischen Vergleichsstudie (Puehringer et al. 2007) wurden weltweit insgesamt 272 Patientenproben aus dem Einzugsbereich von acht verschiedenen Thalassämie-Zentren mit dem α-Globin StripAssay® und den in diesen Labors routinemäßig verwendeten Referenzmethoden getestet. Von den 544 α-Globin-Allelen des Wildtyps oder des mutierten Typs in der Patientenkohorte entsprachen die Ergebnisse von 523 (96,14 %) vollständig den StripAssay® und hausinternen Methoden.

IX. STÖRSUBSTANZEN

Fünf Störsubstanzen (Hämoglobin, Immunglobulin G, Spuren von Blut, Ethanol und EDTA), die potenziell in DNA-Präparationen aus EDTA-Blut vorhanden sind, wurden getestet. Ihre Auswirkungen auf die PCR wurden in drei gereinigten DNA-Proben, die mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen versetzt waren, bewertet und mit den Kontrollen ohne Zusatz von Störsubstanzen verglichen. Alle Proben wurden dreifach analysiert.

Eine Endkonzentration von < 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.

X. GRENZEN DES ASSAYS

Der α-Globin StripAssay® ist ausschließlich für die Diagnose der 21 in Abschnitt III aufgelisteten bekannten Mutationen vorgesehen, die durch allelspezifische Sonden auf den Teststrips repräsentiert werden. Andere Alpha-Globin-Deletionen, Punktmutationen oder Rekombinationen, die in der Probe eines Patienten vorhanden sein können, können nicht detektiert werden. Allenfalls kann eine unbeachtete Punktmutation, die sich innerhalb einer von einer Fangsonde überspannten Sequenz befindet, durch den Verlust des Wildtypsignals auf dem Teststrip angezeigt werden, wenn sie begleitend mit einer Einzel- oder Doppelgendeletion oder im homozygoten Zustand vorhanden ist.

Seltene oder private Varianten mit Primer- oder Sonden-Bindungsstellen sowie Genkonversionen können zu Amplifizierungsfehlern oder fehlenden Signalen auf Teststrips führen.

Der α-Globin StripAssay® ermöglicht keine Unterscheidung zwischen dem mutierten heterozygoten und homozygoten Zustand der anti-3.7-Gentriplikation (anti-3.7/αα und anti-3.7/anti-3.7).

Bei Vorhandensein großer Gendeletionen, die durch den Assay nicht detektierbar sind, erscheinen Einzelgendeletionen (-3.7 oder -4.2) und Punktmutationen als homozygot.

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

Der α-Globin StripAssay® ist nur für die professionelle Verwendung in Labors gedacht.

XI. QUALITÄTSÜBERLEGUNGEN

- Ein gründliches Verständnis des hier beschriebenen Verfahrens sowie Standard-Labortechniken und geeignete Ausstattung sind erforderlich, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.
- StripAssay®-Kits dürfen nicht über ihr Ablaufdatum hinaus verwendet werden.
- Nach dem ersten Öffnen der Primärverpackung sind StripAssay®-Reagenzien bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2 °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.

XII. SICHERHEIT

- In den vorgesehenen Arbeitsräumen ist Essen, Trinken und Rauchen sowie die Anwendung von Kosmetika untersagt. Tragen Sie Labormäntel und Einweghandschuhe, wenn Sie Proben und Reagenzien handhaben. Waschen Sie sich anschließend gründlich die Hände.
- Behandeln Sie Proben als potentiell infektiös. Säubern und desinfizieren Sie alle Materialien und Oberflächen, die mit Proben in Kontakt sind, gründlich. Entsorgen Sie sämtlichen Müll in Zusammenhang mit klinischen Proben in spezielle Müllcontainer für biologische Risikoabfälle.

- Bringen Sie DNAT und Color Developer nicht in Berührung mit Haut, Augen und Schleimhäuten. Falls dennoch Kontakt erfolgt, waschen Sie es sofort mit viel Wasser ab. Sollten Sie DNAT verschütten, verdünnen Sie es vor dem Aufwischen mit Wasser.
- Befolgen Sie alle gültigen lokalen und staatlichen Sicherheits- und Umweltbestimmungen.

XIII. TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Technische Unterstützung erhalten Sie durch:

- Ihren ViennaLab Diagnostics-Händler vor Ort (www.viennalab.com/distribution)
- Videotutorials (www.viennalab.com/support)
- Das StripAssay® Manual (www.viennalab.com/support)
- Den StripAssay® Troubleshooting Guide (www.viennalab.com/support)
- Kontaktieren von techhelp@viennalab.com













XIV. REFERENZEN

- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man (www.omim.org)
- HbVar-Datenbank (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>)
- Thalassemia International Federation (www.thalassaemia.org.cy)
- Ithamet (www.ithamet.eu)
- Puehringer et al. Clin Chem Lab Med 2007;45(5):605-10

XV. RÜCKMELDUNG AN DEN HERSTELLER

Alle schwerwiegenden Vorkommnisse, die in Verbindung mit dem StripAssay® aufgetreten sind, müssen der zuständigen Behörde des jeweiligen Landes und dem Hersteller gemeldet werden.

XVI. SYMBOLE

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

XVII. BEISPIELE DER TESTERGEBNISSE

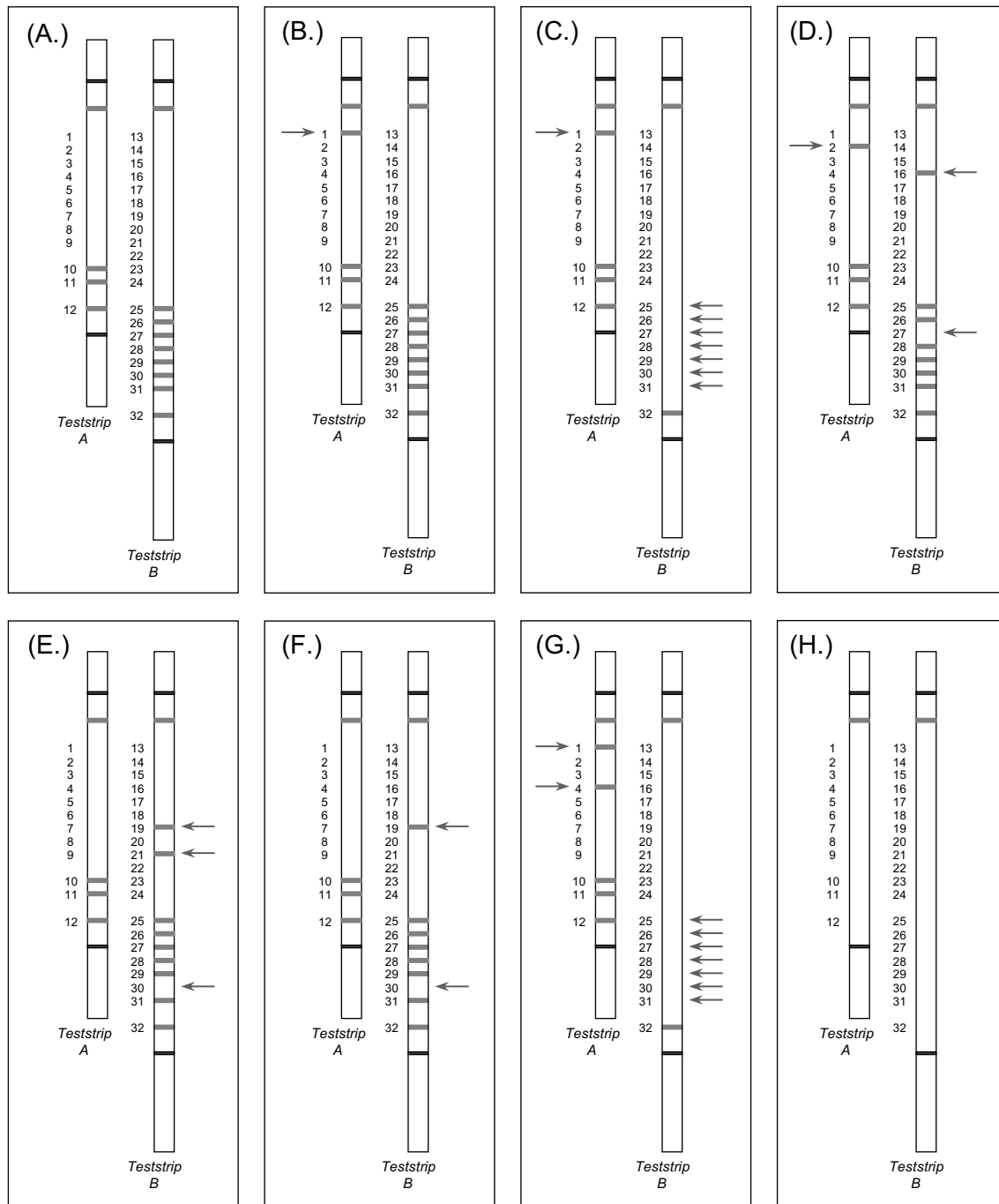



Abb. 3: Beispiele der mit dem α-Globin StripAssay® erhaltenen Ergebnisse

- (A.) normal (αα/αα)
- (B.) -3.7 heterozygot (-3.7/αα)
- (C.) -3.7 homozygot (-3.7/-3.7)
- (D.) -4.2 + IVS1-5nt heterozygot (-4.2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse heterozygot (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring homozygot (HbCS/HbCS)
- (G.) -3.7 + --MED-I heterozygot (-3.7/--MED-I)
- (H.) negative Kontrolle oder PCR-Versagen

NOTIZEN

XVIII. VERWANDTE PRODUKTE

| REF | |  |
|------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 4-125 | β -Globin StripAssay [®] AZE1 | 20 Tests |
| 4-126 | β -Globin StripAssay [®] AZE2 | 20 Tests |
| 4-130 | β -Globin StripAssay [®] MED | 20 Tests |
| 4-140 | β -Globin StripAssay [®] IME | 20 Tests |
| 4-150 | β -Globin StripAssay [®] SEA | 20 Tests |
| 4-160 | α -Globin StripAssay [®] | 10 Tests |
| 4-170 | β -Thal Modifier 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 Diagnostics GmbH

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

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com