

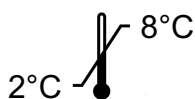
# $\alpha$ -Globin StripAssay<sup>®</sup>

Инструкции за употреба

**REF**



4-160	10 теста
4-160-A	24 теста
4-160-TRIAL	5 теста



**IVD**



Версия: rev 1.3/български  
eIFU и други езици са достъпни на адрес  
[www.viennalab.com](http://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](mailto:info@viennalab.com)

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

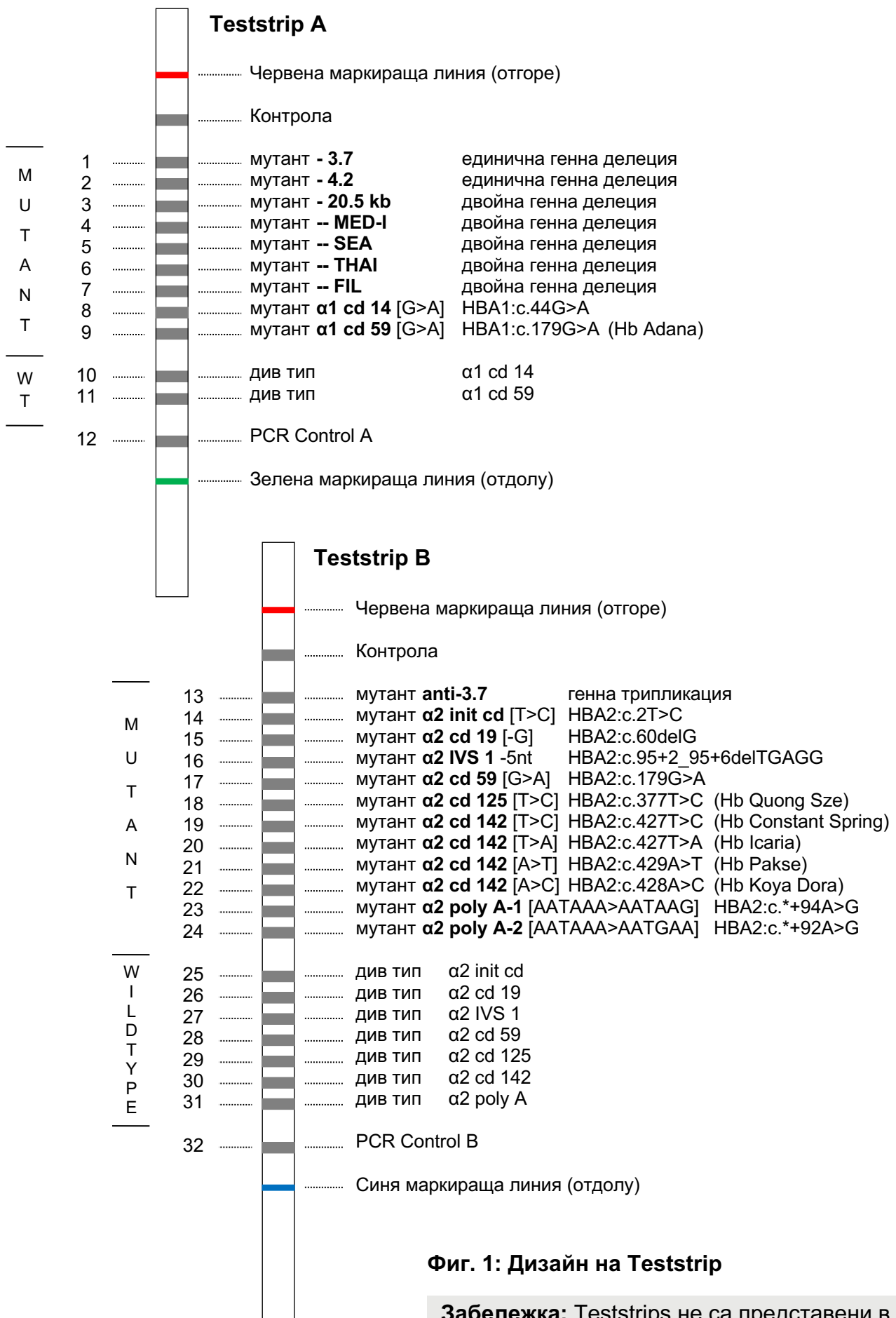
**СЪДЪРЖАНИЕ**

I.	ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ .....	4
II.	ВЪВЕДЕНИЕ .....	4
III.	МЕТОДОЛОГИЯ.....	4
IV.	КОМПОНЕНТИ НА КОМПЛЕКТА.....	6
V.	МАТЕРИАЛИ, КОИТО СЕ ИЗИСКВАТ, НО НЕ СЕ ДОСТАВЯТ.....	7
VI.	ПРОЦЕДУРА ЗА АНАЛИЗ .....	8
VII.	ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ .....	13
VIII.	ОЦЕНКА НА ЕФЕКТИВНОСТТА.....	15
IX.	ИНТЕРФЕРИРАЩИ ВЕЩЕСТВА .....	15
X.	ОГРАНИЧЕНИЯ НА АНАЛИЗА .....	16
XI.	СЪОБРАЖЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С КАЧЕСТВОТО.....	16
XII.	БЕЗОПАСНОСТ .....	17
XIII.	ТЕХНИЧЕСКА ПОДДРЪЖКА.....	17
XIV.	БИБЛИОГРАФИЯ.....	17
XV.	ОБРАТНА ВРЪЗКА КЪМ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	17
XVI.	СИМВОЛИ .....	18
XVII.	ПРИМЕРИ ЗА РЕЗУЛТАТИ ОТ ТЕСТА .....	19
XVIII.	СВЪРЗАНИ ПРОДУКТИ .....	21

**ИСТОРИЯ НА ПРОМЕНЕТЕ:**

версия	дата	описание
ред. 1.1	2022-02	Маркировка CE с идентификационен номер на нотифицирания орган; връзка към резюмето за безопасност и ефективност (SSP, summary of safety and performance); декларация за източника на пробата и ръчна/полуавтоматична употреба (I); спецификация на компонентите на комплекта (IV); данни за клиничната ефективност (VIII)
ред. 1.2	2022-05	Дата на издаване, препратка към електронните инструкции за употреба (eIFU, electronic IFU), Иран (II) вкл.
ред. 1.3	ноември 2022 г.	Подобрено оформление и разделителна способност на фигурите

Резюме относно безопасността и ефективността (SSP, Summary of Safety and Performance) на StripAssay® може да бъде изтеглено от Европейската база данни за медицински изделия (EUDAMED, European Database on Medical Devices): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> или от производителя.



Фиг. 1: Дизайн на Teststrip

**Забележка:** Teststrips не са представени в реален размер и не трябва да се използват за тълкуване на резултатите!

## **I. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ**

α-Globin StripAssay® е качествен генетичен тест за целеви анализ на 21 често срещани големи делеции и точкови мутации на гените на хемоглобиновата субединица алфа-1 (HBA1, hemoglobin subunit alpha) и алфа-2 (HBA2, hemoglobin subunit alpha 2) в ДНК, изолирана от човешка периферна кръв. Тестът се използва като помощно средство за генетично потвърждаване на предполагаема диагноза алфа-таласемия (alpha-thal, alpha-thalassemia). В допълнение, тестът може да се използва за скрининг на статуса на носител на таласемия при роднини на пациента и в общата популация. StripAssay® може да се извършва ръчно или полуавтоматично.

За *инвитро* диагностична употреба при хора.

## **II. ВЪВЕДЕНИЕ**

Мутациите в *алфа-глобиновите* гени са генетичната причина за алфа-таласемията – автозомно-рецесивно наследствено заболяване, което се характеризира с недостатъчна или липсваща продукция на алфа-глобинови вериги, водеща до различна клинична картина в зависимост от броя на засегнатите алели.

Пациенти с характерни хематологични стойности на микроцитна анемия и съответни хемоглобинови модели, членове на семейството на засегнат пациент, бъдещи родители, както и лица от високорискови популации (напр. средиземноморския регион, Африка, Арабския полуостров, Иран, Индия и Югоизточна Азия), за които съществува риск да бъдат носители на алфа-таласемия, трябва да бъдат изследвани.

## **III. МЕТОДОЛОГИЯ**

α-Globin StripAssay® се базира на полимеразна верижна реакция (PCR, polymerase chain reaction) и обратна хибридизация. Процедурата включва три стъпки: (1) изолиране на ДНК, (2) PCR амплификация с помощта на биотинилирани праймери, (3) хибридизация на амплификационните продукти върху Teststrip, съдържаща алел-специфични олигонуклеотидни сонди, имобилизирани като масив от успоредни линии (Фиг. 1). Свързаните биотинилирани секвенции се откриват с помощта на стрептавидин-алкална фосфатаза и цветни субстрати.

α-Globin StripAssay® открива следните мутации в локуса на *алфа-глобиновия* ген:

	предишно наименование	Номенклатура на HGVS	RefSNP
1	-3.7 kb	NG_000006.1:g.34164_37967del3804	--
2	-4.2 kb	не е приложимо	--
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	анти-3.7 генна трипликация	не е приложимо	--
9	cd 14 [G>A]	HBA1:c.44G>A	rs63750090
10	cd 59 [G>A] Hb Adana	HBA1:c.179G>A	rs28928878
11	иницииращ 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

Референтна секвенция (RefSeq, Reference Sequence):

NG\_000006.1



NM\_000558.3 (HBA1)

NM\_000517.4 (HBA2)

Тестът може да се извърши ръчно или полуавтоматично с помощта на инструменти, предназначени за автоматизиране на обработката на Teststrip (вж. раздел VI. 3.4).

IV. КОМПОНЕНТИ НА КОМПЛЕКТА

REF

	4-160	4-160-A	4-160 -TRIAL
1a. <b>Amplification Mix A1</b> (жълта капачка)	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1b. <b>Amplification Mix A2</b> (бяла капачка)	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1c. <b>Amplification Mix B</b> (зелена капачка)	250 µl	2x 250 µl	250 µl
2. <b>Taq Dilution Buffer</b> (прозрачна капачка)	500 µl	500 µl	500 µl
3. <b>HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)</b> (червена капачка)	125 U	175 U	125 U
4. <b>DNAT</b> (синя капачка)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Предупреждение: DNAT съдържа 1,6% NaOH                      H315: Предизвиква дразнене на кожата                      H319: Предизвиква сериозно дразнене на очите                      P280: Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице                      P337 + P313: При продължително дразнене на очите: Потърсете медицински съвет/помощ</p>			
5. <b>Typing Trays</b>	3	---	2
6a. <b>Teststrips A</b> (черна капачка)	10	24	5
6b. <b>Teststrips B</b> (бяла капачка)	10	24	5
7. <b>Hybridization Buffer</b> (бяла капачка)	25 ml	65 ml	25 ml
8. <b>Wash Solution A</b> (бяла капачка)	80 ml	200 ml	80 ml
9. <b>Conjugate Solution</b> (прозрачна капачка)	25 ml	65 ml	25 ml
10. <b>Wash Solution B</b> (прозрачна капачка)	80 ml	200 ml	80 ml
11. <b>Color Developer</b> (кафява капачка)	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Предупреждение: Color Developer съдържа ≤0,4% малеинова киселина                      H317: Може да причини алергична кожна реакция                      P280: Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице                      P302 + P352: При контакт с кожата: измийте обилно с вода                      P333 + P313: При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ</p>			
12. <b>Инструкции за употреба</b>	1	1	1
13. <b>Collector™ Sheet</b>	1	3	1

**Забележка:** Съхранявайте всички реагенти при температура от 2°C до 8°C, когато не се използват!

наименование на компонента	състав
Amplification Mix A1/A2/B	специфични за последователността 5'-биотин маркирани олигонуклеотиди, еквимоларна смес от дезокси рибонуклеотидни трифосфати (dATP, dCTP, dGTP и dTTP), MgCl <sub>2</sub> , буфер на амониев сулфат, бетаин, 0,05% натриев азид
Taq Dilution Buffer	буфер за HS-Taq DNA Polymerase, включващ KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> и MgCl <sub>2</sub> , 0,05% натриев азид
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	hot-start-Taq DNA polymerase в концентрация от 5 U/µl
DNAT	основен разтвор, съдържащ 1,6 % натриев хидроксид и синьо багрило, показващо промяна в рН
Typing Trays	пластмасова табла с осем ямки

наименование на компонента	състав
Teststrips A/B	алел-специфични олигонуклеотидни сонди, контрола за положителна PCR реакция и хибридизационна контрола, имобилизирани като масив от успоредни линии върху мембрана с полиестерна основа, оградена с червена линия отгоре и зелена (Teststrip A) или синя (Teststrip B) линия отдолу
Hybridization Buffer	фосфатен буфер с <2% детергент
Wash Solution A	цитратен буфер с <1% детергент
Conjugate Solution	конюгирана със стрептавидин алкална фосфатаза, разреждана в буфер на основата на физиологичен разтвор с 0,05% натриев азид
Wash Solution B	трис буфер, съдържащ <2% детергент и 0,05% натриев азид
Color Developer	цветен субстрат за алкалната фосфатаза, съдържащ нитро син тетразолий (NBT, nitro blue tetrazolium) и 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
Инструкции за употреба	хартиено копие
Collector™ Sheet	хартиено копие

## V. МАТЕРИАЛИ, КОИТО СЕ ИЗИСКВАТ, НО НЕ СЕ ДОСТАВЯТ

В допълнение към стандартното лабораторно оборудване за молекулярна биология е необходимо следното:

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- Термоциклер с нагряващ се капак (за спецификация на скоростта на нарастване вижте раздел VIII)
- Водна баня с платформа за разклащане, капак и регулируема температура ( $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ )
- Шейкър (люлеещ се или орбитален)

### Незадължително:

- Апарат за вакуумна аспирация
- Термошейкър за микротитърни плаки с капак и регулируема температура ( $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), напр. PST-60 HL (Biosan) или еквивалентно изделие
- Инструмент за автоматична хибридизация, регулируем според профила време-температура, както е описано в раздел VI. 3.4, напр. DYNABLOT Heat (Dyplex) или еквивалентно изделие
- Оборудване за електрофореза с агарозен гел (за контрол на амплификационните продукти)

## VI. ПРОЦЕДУРА ЗА АНАЛИЗ

### 1. Подготовка на пробата

**Проба:** Използвайте прясна или замразена кръв с антикоагулант етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA). Кръв, съдържаща хепарин или цитрат, не е тествана. Не съхранявайте кръвта за повече от 3 дни при стайна температура или за повече от 1 седмица при температура от 2°C до 8°C преди употреба. Кръв, която е била съхранявана в замразено състояние повече от една година или е преминала през повече от три цикъла на замразяване и размразяване, не трябва да се използва. За вземане и транспортиране на пробите следвайте инструкциите за употреба на епруветката за вземане на кръв с EDTA и общите препоръки за вземане на кръвни проби.

**Екстракция на ДНК:** Приведете кръвните проби до стайна температура. Смесете добре, като внимателно обърнете няколко пъти епруветките за вземане на кръв. Повтаряйте смесването всеки път, преди да изтеглите аликвотна част от кръвта. За изолиране на ДНК от цяла кръв се препоръчва употребата на **Spin Micro DNA Extraction Kit** (REF 2-020, ViennaLab). Използването на други методи за изолиране на ДНК с α-Globin StripAssay® не е валидирано. В случай че се използват други системи за екстракция на ДНК, концентрацията и чистотата на ДНК трябва да бъдат съответно в диапазона от 2 до 10 ng/μl и съотношение на OD<sub>A260/280</sub> от 1,7 до 2,0. По-високите концентрации на ДНК трябва да се разреждат до препоръчителния диапазон преди използване в PCR.

**Забележка:** ДНК, съдържаща PCR инхибитори и/или магнитни частици, получени чрез система за екстракция, базирана на микросфери, може да бъде неустойчива на амплификация и трябва да се разрежи до 2 ng/μl, като се използва вода за PCR.

Екстрахираната ДНК се съхранява при температура от 2°C до 8°C (до една седмица) или при температура от -30°C до -15°C (за дълъг период от време) до извършване на анализа.

## 2. In Vitro амплификация (PCR) – 3 отделни реакции на проба

**Важно:** Съхранявайте всички PCR реагенти и ДНК шаблони в хладилник през цялото време.

- Всеки път пригответе пряко подходящо количество работен разтвор (1:15, крайна концентр. 0,33 U/μl) на **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, червена капачка) в **Taq Dilution Buffer** (прозрачна капачка) за броя проби, които ще се анализират, плюс контролата без шаблон (NTC, no-template control).

компонент	на реакция	напр. 10 реакции
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,33 μl	3,3 μl
Taq Dilution Buffer	4,67 μl	46,7 μl
работен разтвор	5 μl	50 μl

- Подгответе три реакционни епруветки за всяка проба, която ще се амплифицира. Поставете епруветките върху лед.
- За всяка проба пригответе 3 крайни реакционни смеси за PCR (A1, A2, B) върху лед:
  - A1: **15 μl Amplification Mix A1** (жълта капачка)
    - 5 μl **разредена HS-Taq DNA Polymerase** (1,66 U)
    - 5 μl **ДНК шаблон**
  - A2: **15 μl Amplification Mix A2** (бяла капачка)
    - 5 μl **разредена HS-Taq DNA Polymerase** (1,66 U)
    - 5 μl **ДНК шаблон**
  - B: **15 μl Amplification Mix B** (зелена капачка)
    - 5 μl **разредена HS-Taq DNA Polymerase** (1,66 U)
    - 5 μl **ДНК шаблон**

**Забележка:** Препоръчва се за всички проби да се приготви основна смес, съдържаща Amplification Mix и разредена HS-Taq DNA Polymerase. Първо пипетирайте 20 μl от основната смес във всяка епруветка за PCR и след това добавете ДНК шаблон. Включете контрола без шаблон при всяко изпълнение, като използвате вода за PCR вместо ДНК (или за предпочитане отрицателната контрола на вашата екстракция на ДНК).

Като цяло пригответе работни разтвори/основна смес с 10% излишен обем, за да компенсирате неточностите при пипетиране.

- Затворете плътно епруветките. Предварително загрейте термоциклера до 95°C.
- Поставете реакционните епруветки и изпълнете следната програма за термоциклиране:
  - преди PCR: 95°C/5 минути**
  - термоциклиране: 97°C/40 секунди – 64°C/40 секунди – 72°C/1:30 часа (3 цикъла)**
  - 97°C/40 секунди – 58°C/40 секунди – 72°C/1:30 часа (37 цикъла)**
  - крайно удължаване: 72°C/5 минути**
- Съхранявайте амплификационните продукти върху лед или при температура от 2°C до 8°C за по-нататъшна употреба.

**Незадължително:** Анализирайте амплификационните продукти чрез гел-електрофореза (напр. 3% агарозен гел).

Дължини на фрагментите: 881 bp; делеции: 1783 bp (A1)  
296 bp; делеции: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 bp (A2)  
302, 864 bp; делеции: 1772 bp (B)

### 3. Обработка на Teststrips

#### 3.1. Хибридизация (ръчна) – 2 Teststrips на проба (45°C, водна баня с разклащане)

**Важно:** Регулирайте нивото на водата във водната баня до приблизително ½ от височината на Typing Tray. Загрейте водната баня до точно 45°C. Проверете температурата на водата с калибриран термометър. Загрейте предварително Hybridization Buffer и Wash Solution A до 45°C. Погрижете се всички утайки, образувани при 2°C до 8°C, да се разтворят напълно. Оставете Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B и Color Developer да достигнат стайна температура. Подгответе необходимия брой Typing Tray.

Отстранете по една Teststrip A и една Teststrip B за всяка проба с помощта на чиста пинсета. Докосвайте Teststrips само с ръкавици без талк! Етикетирайте Teststrips извън маркиращите линии с молив (без химикалки, маркери и др.).

За всички **Teststrips A** (една ивица на проба):

- Пипетирайте **20 µl DNAT** (синя капачка) в долния ъгъл на всяка ивица, която ще се използва в Typing Trays.
- Добавете **10 µl amplification product A1** в съответната капка DNAT.
- Добавете **10 µl amplification product A2** в същата капка.
- Смесете старателно с пипета. (Разтворът ще остане син.)

За всички **Teststrips B** (една ивица на проба):

- Пипетирайте **10 µl DNAT** (синя капачка) в долния ъгъл на всяка ивица, която ще се използва в Typing Trays.
- Добавете **10 µl amplification product B** в съответната капка DNAT.
- Смесете старателно с пипета. (Разтворът ще остане син.)

- Оставете на стайна температура за **5 минути**.
- Добавете **1 ml Hybridization Buffer** (предварително загрят до 45°C) във всяка ивица. Внимателно раздвижвайте таблата. (Синият цвят ще изчезне.)
- Поставете **Teststrip A** или **Teststrip B** с маркираната страна нагоре (при видими линии!) в съответните ивици. Потопете напълно.
- Инкубирайте за **30 минути** при **45°C** върху платформата за разклащане на водната баня.

Задайте умерена честота на разклащане (приблизително 50 rpm), за да избегнете разливане. Дръжте капака на водната баня затворен, за да избегнете промени в температурата.

- В края на инкубацията отстранете хибридизационните разтвори чрез вакуумна аспирация или пипетиране.

Пристъпете към действие незабавно. Не оставяйте Teststrips да изсъхнат по време на цялата процедура.

### **3.2. Стриктно промиване (45°C, водна баня с разклащане)**

- Добавете **1 ml Wash Solution A** (предварително загрят до 45°C). Изплакнете за кратко (10 секунди).  
Отстранете течностите чрез вакуумна аспирация или пипетиране.
- Добавете **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Инкубирайте за **15 минути** при **45°C** във водна баня с разклащане.  
Отстранете течностите чрез вакуумна аспирация или пипетиране.
- Добавете **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Инкубирайте за **15 минути** при **45°C** във водна баня с разклащане.  
Отстранете течностите чрез вакуумна аспирация или пипетиране.

### **3.3. Колориметрично откриване (стайна температура, 22°C ± 3°C)**

- Добавете **1 ml Conjugate Solution**.
- Инкубирайте за **15 минути** на **стайна температура** в люлеещ се или орбитален шейкър.  
Отстранете течностите чрез вакуумна аспирация или пипетиране.
- Добавете **1 ml Wash Solution B**. Изплакнете за кратко (10 секунди).  
Отстранете течностите чрез вакуумна аспирация или пипетиране.
- Добавете **1 ml Wash Solution B**.
- Инкубирайте за **5 минути** на **стайна температура** в люлеещ се или орбитален шейкър.  
Отстранете течностите чрез вакуумна аспирация или пипетиране.
- Добавете **1 ml Wash Solution B**.
- Инкубирайте за **5 минути** на **стайна температура** в люлеещ се или орбитален шейкър.  
Отстранете течностите чрез вакуумна аспирация или пипетиране.
- Добавете **1 ml Color Developer**.
- Инкубирайте за **15 минути** на **стайна температура** на тъмно в люлеещ се или орбитален шейкър.  
При положителна реакция ще се появи лилаво оцветяване.
- Промийте Teststrips няколко пъти с дестилирана вода.  
Оставете лентите да изсъхнат на тъмно върху абсорбираща хартия.

Не излагайте Teststrips на силна светлина след Color Development.

### **3.4. Хибридизация (автоматична) – незадължително вместо водна баня и шейкър**

Инструментът за автоматична обработка на Teststrips трябва да отговаря на следните изисквания:

- Програмируем температурен и времеви профил в съответствие с раздел 3.1 до 3.3 от процедурата StripAssay®.
- Интегрирана станция за предварително загряване на Hybridization Buffer и Wash Solution A.
- Контрол на температурата на таблите по време на стъпките на хибридизация и стриктно промиване при  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Активна система за охлаждане на таблата, която осигурява бързо понижаване на температурата за етапите на колориметрично откриване при стайна температура.
- Възможност за разклащане на таблата.
- Нагряващ се капак за таблата с цел избягване на изпаряването на реагентите по време на инкубацията.
- Разпределяне на определени обеми реагенти.
- Аспирация на реагентите.
- В зависимост от използвания инструмент и броя на пробите, обработвани в рамките на едно изпълнение, може да са необходими допълнителни реагенти. Отделни StripAssay® Detection Reagents са налични за 20 теста (REF CS-012) и 48 теста (REF CS-017).

## VII. ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

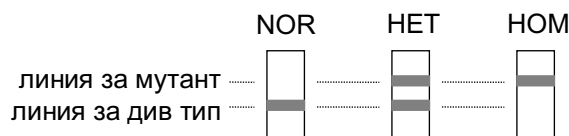
Генотипът на пробата се определя чрез съответните Teststrips A и B, като се използва приложеният Collector™ sheet. Поставете двете обработени Teststrips в определените полета, подравнете ги с чертежа на схемата, като използвате червената маркираща линия (отгоре) и зелената или синята маркираща линия (отдолу), и ги фиксирайте с помощта на залепваща се лента.

Положителната реакция на най-горната контролна линия показва правилното функциониране на Conjugate Solution и Color Developer. Тази линия винаги трябва да е положителна.

Положителната реакция на линиите PCR Control A и PCR Control B показва наличието на правилните продукти за амплификация. Тези линии винаги трябва да се оцветяват положително, с изключение на контролата без шаблон, която съдържа вода вместо ДНК шаблон (вижте пример H, страница 19).

Отсъствието на PCR Controls върху Teststrips може да означава фалшива хибридизация на продуктите за амплификация Mix A1/A2 върху Teststrip B и на продуктите за амплификация Mix B върху Teststrip A. Повторете теста.

За всяка полиморфна позиция трябва да бъде получен един от следните модели на оцветяване (Фиг. 2):



**Фиг. 2: Генотипове – модели на оцветяване на Teststrip**

	линия за див тип	линия за мутант	генотип
NOR	<b>положителна</b>	отрицателна	нормален
HET	<b>положителна</b>	<b>положителна</b>	хетерозиготен
HOM	отрицателна	<b>положителна</b>	хомозиготен мутант

**Забележка:** Интензитетът на оцветяване на положителните линии може да варира. Това е без значение за резултата.

**Вижте примери** за резултати от StripAssay® на страница 19 (Фиг. 3).

Някои от точковите мутации, включени в α-Globin StripAssay®, са разположени в няколко нуклеотида на α-глобиновия ген. Върху Teststrips те са представени с обща сонда от див тип, така че 21-те мутации да бъдат покрити само от 9 сонди от див тип:

линия	сонда от див тип	мутация
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 Dora
31	α2 poly A	α2 poly A-1, α2 poly A-2

Проби, които са комбинирани хетерозиготи за две от тези мутации (напр. Hb Constant Spring + Hb Pakse) няма да имат общ сигнал за див тип (вижте пример E, страница 19).

Проби, които са съставни хетерозиготи за една от мутациите α1/α2 и единична или двойна генна делеция, в повечето случаи нямат съответния сигнал за див тип (вижте пример D, страница 19).

За единични и двойни генни делеции няколко сонди за див тип разграничават хетерозиготното и хомозиготното състояние на мутанта (вижте примери B и C, страница 19):

делеция	хетерозиготен	хомозиготен мутант
- 3.7	присъстват всички сигнали за див тип (WT, wild type)	отсъстват сигнали за WT 25 – 31
- 4.2	присъстват всички сигнали за див тип (WT, wild type)	отсъстват сигнали за WT 25 – 31
- 20.5 kb	присъстват всички сигнали за див тип (WT, wild type)	отсъстват сигнали за WT 10 и 25 – 31
-- MED-I	присъстват всички сигнали за див тип (WT, wild type)	отсъстват всички сигнали за WT
-- SEA	присъстват всички сигнали за див тип (WT, wild type)	отсъстват всички сигнали за WT
-- THAI	присъстват всички сигнали за див тип (WT, wild type)	отсъстват всички сигнали за WT
-- FIL	присъстват всички сигнали за див тип (WT, wild type)	отсъстват всички сигнали за WT

Както при всеки диагностичен тест, резултатите от α-Globin StripAssay® трябва да се тълкуват в контекста на цялостния клиничен фенотип на пациента и другите медицински изследвания, с които разполага лекарят. ViennaLab Diagnostics GmbH не носи отговорност за взетите клинични решения.

## VIII. ОЦЕНКА НА ЕФЕКТИВНОСТТА

**Точността** на α-Globin StripAssay® е определена чрез анализ на 330 предварително типизирани проби от геномна ДНК. С изключение на една проба резултатите съответстват на референтния метод (секвениране по Sanger, gap-PCR, ARMS-PCR, reverse dot-blot analysis, проби, получени от външна оценка на качеството (EQA, External Quality Assessment)). Хетерозиготна polyA-2 проба, възникнала в резултат на рядка рекомбинация на 3' края на *алфа-2* и *псевдоалфа*-гените, е типизирана като фалшиво отрицателна (див тип) чрез StripAssay®. Анализът открива правилно 359 мутантни алела (= 99,7% положително процентно съответствие) и 300 алела от див тип (= 100% отрицателно процентно съответствие).

**Прецизността** на α-Globin StripAssay® е оценена като вариабилност между повторенията, операторите, дните, термоциклерите и устройствата за хибридизация. В общо 62 теста, проведени при изследваните параметри, 61 са показали очакваните резултати за генотипизиране, а една проба е била неуспешна поради неточност при пипетирането на шаблонната ДНК. Видими са само незначителни разлики в интензивността на оцветяване на Teststrips и не се наблюдава фоново оцветяване. α-Globin StripAssay® е валидиран на AB GeneAmp® PCR System 2700, MJ Research PTC-200 и Eppendorf Mastercycler X50s, които представляват скорост на нагриване и охлаждане в диапазона, съответно от 1,7 до 6,3°C/sec и от 1,4 до 3,7°C/sec.

Употребата на други термоциклери трябва да се провери от потребителя.

**Аналитичната специфичност** се осигурява преди всичко чрез подбора на ген-специфичните праймери и алел-специфичните сонди за улавяне, както и чрез подбора на строги условия за реакция. Праймерите и сондите са проверени за възможни хомологии с всички секвенции, публикувани в генните бази данни, чрез анализ за сравнение на секвенциите. По този начин е осигурена откриваемост на всички съответни генотипове. Потенциалната кръстосана реактивност между сондите за улавяне е проверена чрез синтетична ДНК, съдържаща съответния генен фрагмент. Не е наблюдавана кръстосана реактивност.

**Клинична ефективност:** В многоцентрово сравнително проучване (Puehringer et al. 2007) общо 272 проби от пациенти от района на осем различни центъра за лечение на таласемия по света са тествани с α-Globin StripAssay® и с рутинно използваните референтни методи в тези лаборатории. От 544 алела от див тип или мутант на α-глобин в кохортата от пациенти, резултатите при 523 (96,14%) са напълно съвместими между StripAssay® и вътрешните методи.

## IX. ИНТЕРФЕРИРАЩИ ВЕЩЕСТВА

Тествани са пет интерфериращи вещества (хемоглобин, имуноглобулин G, следи от кръв, етанол и EDTA), които потенциално могат да присъстват в ДНК препарати, получени от кръв с EDTA. Ефектите им върху PCR са оценени в три пречистени ДНК проби с добавени различни концентрации на веществата и сравнени с контролите им без добавяне на интерфериращи вещества. Всички проби са анализирани в три повторения.

Крайна концентрация от <10 μM хемоглобин, 0,1 μM имуноглобулин G, <1% периферна кръв, 1,25% етанол или 0,1 mM EDTA в реакцията не пречи на ефективността на StripAssay®.

## **X. ОГРАНИЧЕНИЯ НА АНАЛИЗА**

α-Globin StripAssay® е предназначен изключително за диагностицирането на 21 известни мутации, изброени в раздел III, които са представени чрез алел-специфични сонди за улавяне върху Teststrips. Други алфа-глобинови делеции, точкови мутации или рекомбинации, които може да присъстват в пробата на пациента, не могат да бъдат открити. В най-добрия случай пренебрегната точкова мутация, разположена в рамките на секвенцията, обхваната от сондата за улавяне, може да бъде демонстрирана чрез загубата на сигнал от див тип върху Teststrip, когато тя присъства едновременно с единична или двойна генна делеция в хомозиготно състояние.

Редки или частни варианти в местата за свързване на праймерите и сондите, както и генни конверсии, могат да доведат до неуспешно амплифициране и липса на сигнали върху Teststrips.

α-Globin StripAssay® не позволява да се направи разграничение между хетерозиготното и хомозиготното мутантно състояние на анти-3.7 генна трипликация (anti-3.7/αα и anti-3.7/anti-3.7).

При наличие на големи генни делеции, които не могат да бъдат открити чрез анализа, единичните генни делеции (-3,7 или -4,2) и точковите мутации се представят като хомозиготни.

α-Globin StripAssay® не трябва да се използват за целите на пренаталната диагностика или преимплантационната генетична диагностика. Анализът не е валидиран за проби, получени от хорионни вили, амниотична течност или кръв от пъпна връв.

α-Globin StripAssay® е предназначен само за професионална употреба в лаборатория.

## **XI. СЪОБРАЖЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С КАЧЕСТВОТО**

- За получаване на надеждни резултати е необходимо задълбочено разбиране на описаната тук процедура, както и стандартни лабораторни техники и подходящо оборудване.
- Не използвайте комплектите StripAssay® след изтичането на срока им на годност.
- След първоначалното отваряне на първичния контейнер реагентите StripAssay® са стабилни до датата на изтичане на срока на годност, отпечатана върху външния етикет на комплекта, когато се съхраняват правилно при температура от 2°C до 8°C.
- Използвайте стерилни крайници за пипети за еднократна употреба с филтри, за да избегнете микробно замърсяване и кръстосано замърсяване на реагентите или пробите. Не разменяйте капачките на бутилките.
- Само за еднократна употреба.

## **XII. БЕЗОПАСНОСТ**

- Не пийте, не яжте, не пушете и не използвайте козметика в определените работни зони. Носете лабораторни престилки и ръкавици за еднократна употреба, когато работите с проби и реагенти от комплекта. След това измивайте добре ръцете си.
- Работете с пробите така, сякаш са носители на заразни агенти. Старателно почиствайте и дезинфекцирайте всички материали и повърхности, които са били в контакт с проби. Изхвърляйте всички отпадъци, свързани с клинични проби, в контейнер за биологично опасни отпадъци.
- Избягвайте контакт на DNAT и Color Developer с кожата, очите или лигавиците. При контакт незабавно промийте с голямо количество вода. При разливане разрежете с вода, преди да избършете до сухо.
- Спазвайте всички приложими местни и федерални разпоредби за безопасност и опазване на околната среда.

## **XIII. ТЕХНИЧЕСКА ПОДДРЪЖКА**

Техническа поддръжка можете да получите чрез:

- местния дистрибутор на ViennaLab Diagnostics ([www.viennalab.com/distribution](http://www.viennalab.com/distribution));
- учебни видеоклипове ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support));
- ръководството на StripAssay® ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support));
- StripAssay® Troubleshooting Guide (Ръководство за отстраняване на неизправности) ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- връзка с [techhelp@viennalab.com](mailto:techhelp@viennalab.com).












## **XIV. БИБЛИОГРАФИЯ**

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

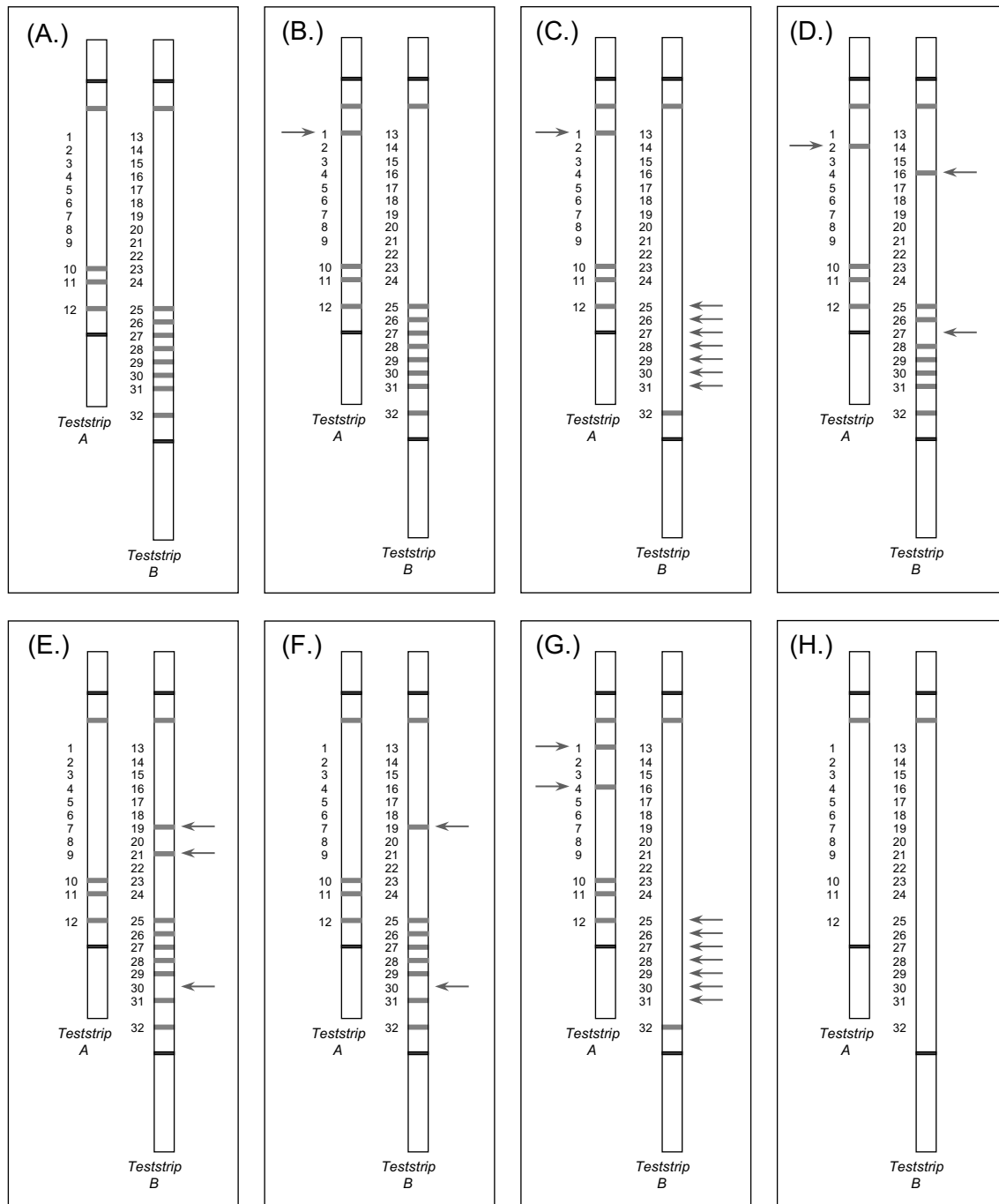
## **XV. ОБРАТНА ВРЪЗКА КЪМ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ**

Всеки сериозен инцидент, възникнал във връзка със StripAssay®, трябва да се докладва на компетентния орган в страната и на производителя.

## XVI. СИМВОЛИ

	Каталожен номер
	Код на партида
	Медицинско изделие за <i>инвитро</i> диагностика
	В съответствие с Регламент 2017/746 на Европейския парламент за медицинските изделия за инвитро диагностика (IVD) Идентификационен номер на нотифицирания орган
	Достатъчно за <n> теста
	Граници на температурата на съхранение
	Годно до
	Внимание
	Производител
	Дата на производство
	Вижте инструкциите за употреба

**XVII. ПРИМЕРИ ЗА РЕЗУЛТАТИ ОТ ТЕСТА**



**Фиг. 3: Примери за резултати, получени с α-StripAssay®**

- (A.) нормален (αα/αα)
- (B.) -3.7 хетерозиготен (-3.7/αα)
- (C.) -3.7 хомозиготен (-3.7/-3.7)
- (D.) -4.2 + IVS1-5nt хетерозиготен (-4.2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse хетерозиготен (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring хомозиготен (HbCS/HbCS)
- (G.) -3.7 + --MED-I хетерозиготен (-3.7/--MED-I)
- (H.) негативна контрола или неуспешен PCR

**ЗАБЕЛЕЖКИ:**

## XVIII. СВЪРЗАНИ ПРОДУКТИ

**REF**



4-125	β-Globin StripAssay® AZE1	20 теста
4-126	β-Globin StripAssay® AZE2	20 теста
4-130	β-Globin StripAssay® MED	20 теста
4-140	β-Globin StripAssay® IME	20 теста
4-150	β-Globin StripAssay® SEA	20 теста
4-160	α-Globin StripAssay®	10 теста
4-170	β-Thal Modifier StripAssay®	20 теста
CS-012	StripAssay® Detection Reagents	20 теста
CS-017	StripAssay® Detection Reagents 48	48 теста
2-014	GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System	100 екстракции
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 екстракции
6-080	Typing Trays	5

**Дистрибутор:**



**Производител:**

**B|G** **ViennaLab®**

**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)