

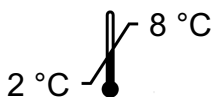
# $\alpha$ -Globin StripAssay<sup>®</sup>

Návod k použití

**REF**



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



**IVD**



Verze: rev 1.3 / česky  
Elektronický návod k použití a další jazyky  
jsou k dispozici na adrese  
[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)

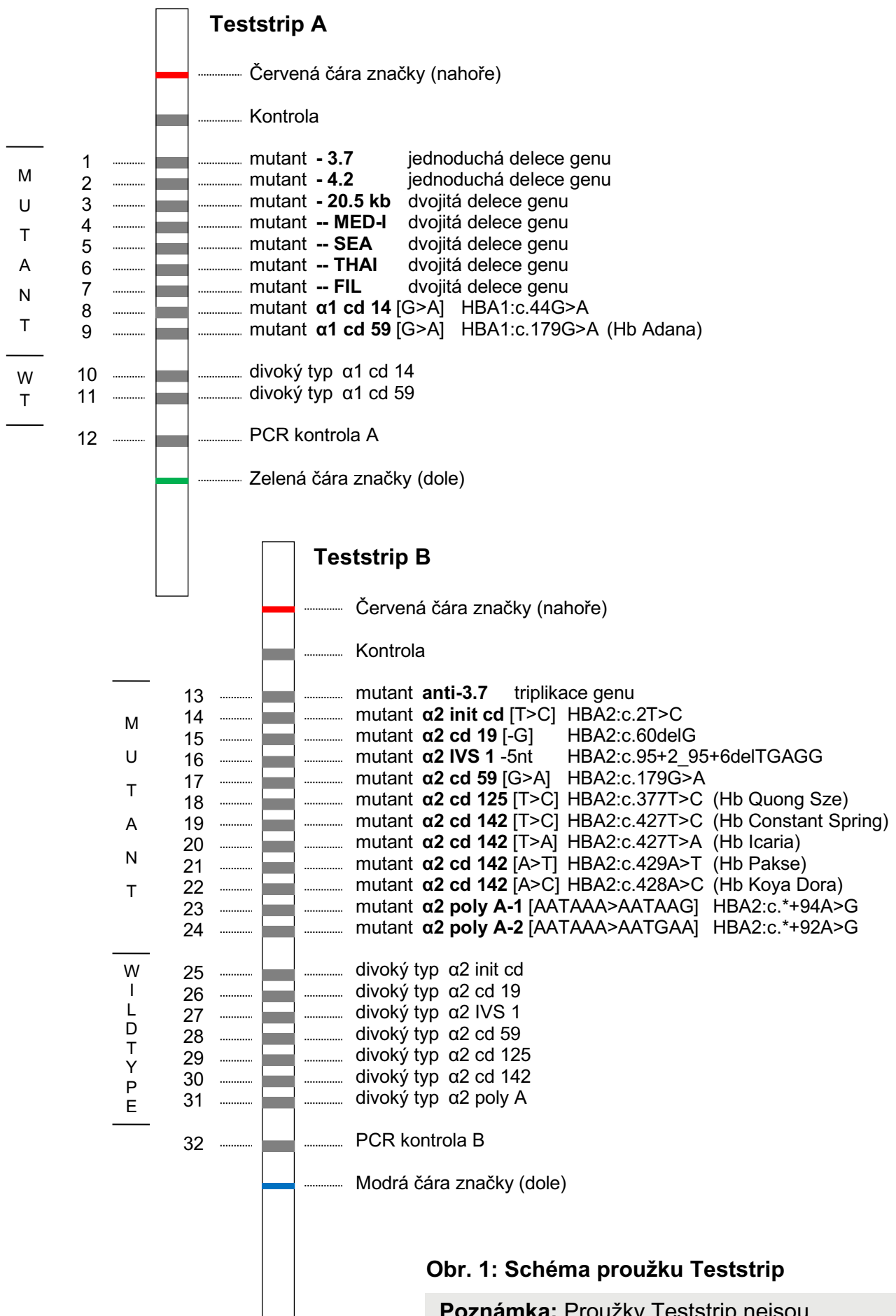
**OBSAH**

I.	ÚČEL POUŽITÍ.....	4
II.	ZÁKLADNÍ INFORMACE .....	4
III.	METODIKA.....	4
IV.	SOUČÁSTI SOUPRAVY .....	6
V.	POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY .....	7
VI.	POUŽITÍ .....	8
VII.	INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	12
VIII.	HODNOCENÍ VÝKONNOSTI.....	14
IX.	INTERFERUJÍCÍ LÁTKY .....	14
X.	OMEZENÍ TESTU .....	15
XI.	HLEDISKA KVALITY .....	15
XII.	BEZPEČNOST .....	15
XIII.	TECHNICKÁ PODPORA.....	16
XIV.	LITERATURA .....	16
XV.	ZPĚTNÁ VAZBA VÝROBCI .....	16
XVI.	SYMBOLY .....	17
XVII.	PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ TESTU.....	18
XVIII.	SOUVISEJÍCÍ PRODUKTY .....	20

**HISTORIE REVIZÍ:**

<b>Verze</b>	<b>Datum</b>	<b>Popis</b>
rev. 1.1	2022-02	Označení CE s identifikačním číslem notifikovaného subjektu; odkaz na SSP; prohlášení o zdroji vzorku a ručním/poloautomatickém použití (I); specifikace součásti souprav (IV); údaje klinického výkonu (VIII)
rev. 1.2	2022-05	Datum vydání, odkaz na elektronický návod k použití (eIFU), Írán (II) je doplněn
rev. 1.3	2022-11	Vylepšené rozložení a rozlišení obrázků

Souhrn bezpečnosti a účinnosti (SSP, Summary of Safety and Performance) testu StripAssay® lze získat z Evropské databáze zdravotnických prostředků (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> nebo od výrobce.



**Obr. 1: Schéma proužku Teststrip**

**Poznámka:** Proužky Teststrip nejsou nakreslené ve skutečné velikosti a nesmí se používat k interpretaci výsledků.

## I. ÚČEL POUŽITÍ

Test  $\alpha$ -Globin StripAssay® je kvalitativní genetický test k cílené analýze 21 běžných velkých delecí a bodových mutací genu *podjednotky hemoglobinu alfa 1 (HBA1, hemoglobin subunit alpha 1)* a *alfa 2 (HBA2, hemoglobin subunit alpha 2)* v DNA izolované z lidské periferní krve. Test se používá jako pomůcka ke genetickému potvrzení podezření na diagnózu alfa-talasémie (alfa-tal). Dále se test používá ke screeningu stavu přenašeče talasémie u příbuzných pacienta a v běžné populaci. Test StripAssay® lze provádět buď ručně, nebo poloautomaticky.

K humánnímu diagnostickému použití *in vitro*.

## II. ZÁKLADNÍ INFORMACE

Mutace v genech *alfa globinu* jsou genetickou příčinou alfa-talasémie, autozomálně recesivní dědičné poruchy, která je charakterizována nedostatečnou nebo chybějící tvorbou řetězce alfa globinu, což vede k variabilnímu klinickému obrazu v závislosti na počtu postižených alel.

Je třeba testovat pacienty s charakteristickými hematologickými hodnotami mikrocytární anémie a odpovídajícími vzory hemoglobinu, členy rodiny postiženého pacienta, nastávající rodiče a také jedince z vysoce rizikových populací (např. ze Středomořské oblasti, Afriky, Arabského poloostrova, Íránu, Indie a Jihovýchodní Asie), u nichž existuje riziko, že jsou přenašeči alfa-talasémie.

## III. METODIKA

Test  $\alpha$ -Globin StripAssay® je založen na polymerázové řetězové reakci (PCR, polymerase chain reaction) a reverzní hybridizaci. Postup zahrnuje tři kroky: (1) izolaci DNA, (2) amplifikaci PCR pomocí biotinylovaných primerů, (3) hybridizaci amplifikačních produktů s proužkem Teststrip obsahujícím alelově specifické oligonukleotidové sondy imobilizované jako pole paralelních linií (Obr. 1). Navázané biotinylované sekvence se detekují pomocí streptavidin-alkalické fosfatázy a barevných substrátů.

Test α-Globin StripAssay® detekuje následující mutace v genovém loku *alfa globinu*:

Starší název	Nomenklatura HGVS	RefSNP
1 -3.7 kb	NG_000006.1:g.34164_37967del3804	--
2 -4.2 kb	--	--
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 Triplikace genu anti-3.7	--	--
9 cd 14 [G>A]	HBA1:c.44G>A	rs63750090
10 cd 59 [G>A] Hb Adana	HBA1:c.179G>A	rs28928878
11 Iniclace 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

Referenční sekvence (RefSeq, Reference Sequence):

NG\_000006.1



NM\_000558.3 (HBA1)

NM\_000517.4 (HBA2)

Test lze provádět ručně nebo poloautomaticky pomocí přístrojů určených k automatizaci zpracování proužků Teststrip (viz část VI. 3.4).

**IV. SOUČÁSTI SOUPRAVY**

**REF**

	<b>4-160</b>	<b>4-160-A</b>	<b>4-160 -TRIAL</b>
1a. <b>Amplification Mix A1</b> (žluté víčko)	250 µl	2× 250 µl	250 µl
1b. <b>Amplification Mix A2</b> (bílé víčko)	250 µl	2× 250 µl	250 µl
1c. <b>Amplification Mix B</b> (zelené víčko)	250 µl	2× 250 µl	250 µl
2. <b>Taq Dilution Buffer</b> (průhledné víčko)	500 µl	500 µl	500 µl
3. <b>HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)</b> (červené víčko)	125 U	175 U	125 U
4. <b>DNAT</b> (modré víčko)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Varování: DNAT obsahuje 1,6% NaOH                      H315: Dráždí kůži                      H319: Způsobuje vážné podráždění očí                      P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít                      P337 + P313: Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.</p>			
5. <b>Typing Trays</b>	3	---	2
6a. <b>Teststrip A</b> (černé víčko)	10	24	5
6b. <b>Teststrip B</b> (bílé víčko)	10	24	5
7. <b>Hybridization Buffer</b> (bílé víčko)	25 ml	65 ml	25 ml
8. <b>Wash Solution A</b> (bílé víčko)	80 ml	200 ml	80 ml
9. <b>Conjugate Solution</b> (průhledné víčko)	25 ml	65 ml	25 ml
10. <b>Wash Solution B</b> (průhledné víčko)	80 ml	200 ml	80 ml
11. <b>Color Developer</b> (hnědé víčko)	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Varování: Color Developer obsahuje ≤ 0,4% kyseliny maleinovou                      H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci                      P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít                      P302 + P352: Při styku s kůží: Omyjte velkým množstvím vody                      P333 + P313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření</p>			
12. <b>Návod k použití</b>	1	1	1
13. <b>Collector™ Sheet</b>	1	3	1

**Poznámka:** Všechna činidla, která nepoužíváte, skladujte při teplotě 2 °C až 8 °C.

<b>Název součásti</b>	<b>Složení</b>
Amplification Mix A1/A2/B	sekvenčně specifické 5'-biotinem značené oligonukleotidy, ekvimolární směs deoxyribonukleotidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP a dTTP), MgCl <sub>2</sub> , pufr se síranem amonným, betain, 0,05% azid sodný
Taq Dilution Buffer	pufr pro polymerázu HS-Taq DNA Polymerase, včetně KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a MgCl <sub>2</sub> , 0,05% azid sodný
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	hot-start Taq DNA polymerase v koncentraci 5 U/µl
DNAT	zásaditý roztok obsahující 1,6 % hydroxidu sodného a modré barvivo, které indikuje změnu pH
Typing Trays	plastový zásobník s osmi jamkami

Název součásti	Složení
Teststrip A/B	alelově specifické oligonukleotidové sondy, kontrola pro pozitivní PCR reakci a hybridizační kontrola imobilizované jako řada paralelních linií na membráně podložené polyesterem, ohraničené červenou čarou nahoře a zelenou (Teststrip A) nebo modrou (Teststrip B) čarou dole
Hybridization Buffer	fosfátový pufr s < 2 % detergentu
Wash Solution A	fosfátový pufr s < 1 % detergentu
Conjugate Solution	se streptavidinem konjugovaná alkalická fosfatáza zředěná puftrem na bázi solného roztoku s 0,05 % azidu sodného
Wash Solution B	tris pufr obsahující < 2 % detergentu a 0,05 % azidu sodného
Color Developer	barevný substrát pro alkalickou fosfatázu obsahuje nitrotetrazoliovou modř (NBT, nitro blue tetrazolium) a 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
Návod k použití	tiskařský papír
Collector™ Sheet	tiskařský papír

## V. POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Kromě standardního laboratorního vybavení pro molekulární biologii je zapotřebí:

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- termocykler s vyhříváním víkem (rychlost růstu teploty viz část VIII),
- vodní lázeň s třepací plošinou, víkem a nastavitelnou teplotou ( $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ),
- třepačka (houpací nebo orbitální třepačka).

### Volitelné:

- vakuový odsávací aparát,
- termotřepačka pro formát mikrotitrační destičky s víkem a nastavitelnou teplotou ( $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ), např. PST-60 HL (Biosan) nebo podobné zařízení,
- přístroj pro automatickou hybridizaci, nastavitelný na profil času-teploty popsany v části VI. 3.4, např. DYNABLOT Heat (Dynex) nebo podobné zařízení,
- zařízení pro elektroforézu na agarózovém gelu (ke kontrole amplifikačních produktů).

## VI. POUŽITÍ

### 1. Příprava vzorků

**Vzorek:** Použijte čerstvou nebo zmrazenou krev s antikoagulantem EDTA. Krev obsahující heparin nebo citrát nebyla testována. Před použitím neuchovávejte krev déle než 3 dny při pokojové teplotě nebo déle než 1 týden při teplotě 2 °C až 8 °C. Krev, která byla uchovávána zmrazená déle než jeden rok nebo prošla více než třemi cykly zmrazení a rozmrazení, se použít nesmí. Při odběru a přepravě vzorků dodržujte návod k použití zkumavky pro odběr EDTA krve a obecná doporučení pro odběr krve.

**Extrakce DNA:** Vzorky krve nechte ustát na pokojovou teplotu. Zkumavky pro odběr krve několikrát opatrně převraťte, aby se obsah dobře promíchal. Před každým odejmutím alikvotu krve zkumavku promíchejte znovu. K izolaci DNA z plné krve se doporučuje použít **Spin Micro DNA Extraction Kit** (REF 2-020, ViennaLab). Použití jiných způsobů izolace DNA testem α-Globin StripAssay® nebylo validováno. V případě použití jiných systémů extrakce DNA musí být koncentrace a čistota DNA v rozmezí 2 až 10 ng/μl a poměr  $OD_{A260/280}$  1,7 až 2,0. Vyšší koncentrace DNA musí být před dodáním vzorku do PCR naředěny na doporučený rozsah.

**Poznámka:** DNA obsahující inhibitory PCR nebo magnetické částice odvozené z extrakčního systému na bázi kuliček mohou být refrakterní vůči amplifikaci a musí se naředit na koncentraci 2 ng/μl vodou v kvalitě pro PCR.

Extrahovaná DNA se uchovává při teplotě 2 °C až 8 °C (až jeden týden) nebo při teplotě –30 °C až –15 °C (dlouhodobě) až do provedení analýzy.

## 2. In vitro amplifikace (PCR) – 3 oddělené reakce na vzorek

**Důležité:** Všechna činidla PCR a templáty DNA uchovávejte v chladničce.

- Pokaždé připravte příslušné množství čerstvého pracovního roztoku (1 : 15, konečná konc. 0,33 U/μl) **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, červené víčko) v pufru **Taq Dilution Buffer** (průhledné víčko) pro daný počet analyzovaných vzorků a **kontrolu bez templátu** (NTC, no-template control).

Součást	Na reakci	Např. na 10 reakcí
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,33 μl	3,3 μl
Taq Dilution Buffer	4,67 μl	46,7 μl
pracovní roztok	5 μl	50 μl

- Připravte tři reakční zkumavky pro každý vzorek, který má být amplifikován. Zkumavky umístěte na led.
- Pro každý vzorek připravte 3 konečné PCR reakční směsi (A1, A2, B) na ledu:
  - A1: **15 μl Amplification Mix A1** (žluté víčko)  
**5 μl naředěné polymerázy HS-Taq DNA Polymerase** (1,66 U)  
**5 μl templátu DNA**
  - A2: **15 μl Amplification Mix A2** (bílé víčko)  
**5 μl naředěné polymerázy HS-Taq DNA Polymerase** (1,66 U)  
**5 μl templátu DNA**
  - B: **15 μl Amplification Mix B** (zelené víčko)  
**5 μl naředěné polymerázy HS-Taq DNA Polymerase** (1,66 U)  
**5 μl templátu DNA**

**Poznámka:** Doporučujeme připravit mastermix pro všechny vzorky, které obsahují směs Amplification Mix a naředěnou polymerázu HS-Taq DNA Polymerase. Nejprve napipetujte 20 μl mastermixu do každé zkumavky PCR a pak přidejte templát DNA. Do každého běhu analýzy zahrňte kontrolu bez templátu s použitím vody v kvalitě pro PCR místo DNA (nebo pokud možno negativní kontroly extrakce DNA).

Obvykle se pracovní roztoky / mastermix připravují s 10% přebytkem objemu, aby se kompenzovaly nepřesnosti při pipetování.

- Zkumavky pevně uzavřete. Předehřejte termocykler na teplotu 95 °C.
- Vložte reakční zkumavky a spusťte následující program termocyklace:
  - před PCR: 95 °C / 5 min.**
  - termocyklace: 97°C / 40 s – 64°C / 40 s – 72 °C / 1:30 min. (3 cyklů)**  
**97°C / 40 s – 58°C / 40 s – 72 °C / 1:30 min. (37 cyklů)**
  - konečné prodloužení: 72°C / 5 min.**
- Amplifikační produkty uchovávejte k dalšímu použití na ledu nebo pro při teplotě 2 °C až 8 °C.

**Volitelné:** Analyzujte amplifikační produkty gelovou elektroforézou (např. 3% agarózový gel).

Délka fragmentů: 881 párů bází; delece: 1783 párů bází (A1)  
 296 párů bází; delece: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 párů bází (A2)  
 302, 864 párů bází; delece: 1772 párů bází (B)

### 3. Zpracování proužků Teststrip

#### 3.1. Hybridizace (ruční) – 2 proužky Teststrip na vzorek (45 °C, vodní lázeň s třepáním)

**Důležité:** Nastavte hladinu vody ve vodní lázni přibližně na polovinu výšky zásobníku Typing Tray. Vodní lázeň zahřejte přesně na 45 °C. Teplotu vody zkontrolujte kalibrovaným teploměrem. Předehřejte pufr Hybridization Buffer a roztok Wash Solution A na teplotu 45 °C. Dávejte pozor, aby se všechny sraženiny vytvořené při teplotě 2 °C až 8 °C zcela rozpustily. Nechte proužky Teststrip, DNAT, roztok Conjugate Solution, Wash Solution B a Color Developer dosáhnout pokojové teploty. Připravte zásobníky Typing Trays.

Čistou pinzetou vyjměte na jeden vzorek jeden proužek Teststrip A a jeden proužek Teststrip B. Proužků Teststrip se dotýkejte pouze nepudrovanými rukavicemi! Tužkou (ne kuličkovým perem, fixem ani ničím jiným) označte proužky Teststrip mimo čáry značek.

Pro všechny proužky **Teststrip A** (jeden pruh na vzorek):

- Napipetujte **20 µl DNAT** (modré víčko) do dolního rohu každého pruhu, který se má použít v zásobnících Typing Trays.
- Do příslušné kapky DNAT přidejte **10 µl amplifikačního produktu A1**.
- Do stejné kapky přidejte **10 µl amplifikačního produktu A2**.
- Důkladně zamíchejte pipetou. (Roztok zůstane modrý.)
- Nechte ustát **5 min.** při pokojové teplotě.
- Do každého pruhu přidejte **1 ml pufru Hybridization Buffer** (předehřátého na teplotu 45 °C). Zásobník jemně protřepejte. (Modrá barva zmizí.)
- Vložte proužky **Teststrip A** nebo **Teststrip B** vyznačenou stranou vzhůru (čáry jdou vidět!) do příslušného pruhu. Zcela ponořte.
- Inkubujte **30 min.** při teplotě **45 °C** na třepací plošině vodní lázně.

Pro všechny proužky **Teststrip B** (jeden pruh na vzorek):

- Napipetujte **10 µl DNAT** (modré víčko) do dolního rohu každého pruhu, který se má použít v zásobnících Typing Trays.
- Do příslušné kapky DNAT přidejte **10 µl amplifikačního produktu B**.
- Důkladně zamíchejte pipetou. (Roztok zůstane modrý.)

Nastavte mírnou frekvenci protřepávání (přibližně 50 ot./min), aby nedošlo k rozlití. Nechte kryt vodní lázně zavřený, aby nedocházelo ke změně teploty.

- Na konci inkubace hybridizační roztoky odstraňte vakuovou aspirací nebo pipetováním.

Ihned pokračujte. Během celého postupu dávejte pozor, aby proužky Teststrip nevyschly.

#### 3.2. Důkladné promytí (45 °C, vodní lázeň s třepáním)

- Přidejte **1 ml roztoku Wash Solution A** (předehřátého na teplotu 45 °C). Krátce opláchněte (10 s). Kapalinu odstraňte vakuovým odsáváním nebo pipetováním.
- Přidejte **1 ml roztoku Wash Solution A** (45 °C).
- Inkubujte **15 min.** při teplotě **45 °C** ve vodní lázni s třepáním. Kapalinu odstraňte vakuovým odsáváním nebo pipetováním.
- Přidejte **1 ml roztoku Wash Solution A** (45 °C).
- Inkubujte **15 min.** při teplotě **45 °C** ve vodní lázni s třepáním. Kapalinu odstraňte vakuovým odsáváním nebo pipetováním.

**3.3. Kolorimetrická detekce** (pokojová teplota, 22 °C ± 3 °C)

- Přidejte **1 ml roztoku Conjugate Solution**.
- Inkubujte **15 min.** při **pokojové teplotě** na houpací nebo orbitální třepačce. Kapalinu odstraňte vakuovým odsáváním nebo pipetováním.
- Přidejte **1 ml roztoku Wash Solution B**. Krátce opláchněte (10 s). Kapalinu odstraňte vakuovým odsáváním nebo pipetováním.
- Přidejte **1 ml roztoku Wash Solution B**.
- Inkubujte **5 min.** při **pokojové teplotě** na houpací nebo orbitální třepačce. Kapalinu odstraňte vakuovým odsáváním nebo pipetováním.
- Přidejte **1 ml roztoku Wash Solution B**.
- Inkubujte **5 min.** při **pokojové teplotě** na houpací nebo orbitální třepačce. Kapalinu odstraňte vakuovým odsáváním nebo pipetováním.
- Přidejte **1 ml přípravku Color Developer**.
- Inkubujte **15 min.** při **pokojové teplotě** v temnu na houpací nebo orbitální třepačce. Při pozitivní reakci se objeví fialové zbarvení.
- Proužky Teststrip několikrát promyjte destilovanou vodou. Nechte proužky uschnout v temnu na savém papíře.

Po vyvolání barvy nevystavujte proužky Teststrip intenzivnímu světlu.

**3.4. Hybridizace (automatická)** – volitelně místo vodní lázně a třepačky

Přístroj pro automatické zpracování proužků Teststrip musí splňovat následující požadavky:

- Programovatelný teplotní a časový profil v souladu s částí 3.1 až 3.3 postupu testu StripAssay®.
- Integrovaná přehřívací stanice pro pufr Hybridization Buffer a roztok Wash Solution A.
- Ovládání teploty zásobníků během kroků hybridizace a důkladného promytí při teplotě 45 °C ± 1 °C.
- Systém aktivního chlazení pro zásobník zajišťující rychlý pokles teploty pro kroky kolorimetrické detekce při pokojové teplotě.
- Schopnost třepání zásobníku.
- Vyhřívané víko zásobníku, aby během inkubace nedocházelo k odpařování činidel.
- Rozdělení definovaných objemů činidel.
- Aspirace činidel.
- V závislosti na použitém přístroji a počtu vzorků zpracovaných v jednom běhu analýzy mohou být zapotřebí další činidla. Samostatná činidla StripAssay® Detection Reagents jsou k dispozici pro 20 testů (REF CS-012) a 48 testů (REF CS-017).

## VII. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

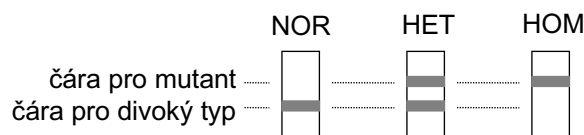
Genotyp vzorku se určí z odpovídajícího proužku Teststrip A a B pomocí přiloženého listu Collector™ sheet. Umístěte zpracované proužky Teststrip do určených polí, zarovnejte je se schematickým nákresem pomocí červené čáry značky (nahore) a zelené nebo modré čáry značky (dole) a připevněte je lepicí páskou.

Pozitivní reakce nejvyšší kontrolní čáry indikuje správnou funkci roztoku Conjugate Solution a přípravku Color Developer. Tato čára by měla být vždy pozitivní.

Čáry s pozitivní reakcí PCR kontroly A a PCR kontroly B označují přítomnost správných amplifikačních produktů. Tyto čáry musí být vždy pozitivní s výjimkou kontroly bez templátu, která obsahuje na místě templátu DNA vodu (viz příklad H, strana 18).

Nepřítomnost PCR kontrol na proužcích Teststrip může naznačovat falešnou hybridizaci amplifikačních produktů Mix A1/A2 k proužku Teststrip B a amplifikačních produktů Mix B k proužku Teststrip A. Opakujte testování.

Pro každou polymorfní polohu je třeba získat jeden z následujících vzorů barvení (Obr. 2):



**Obr. 2: Genotypy – barevné vzory na proužku Teststrip**

	čára pro divoký typ	čára pro mutant	genotyp
NOR	<b>pozitivní</b>	negativní	normální
HET	<b>pozitivní</b>	<b>pozitivní</b>	heterozygotní
HOM	negativní	<b>pozitivní</b>	homozygotní mutant

**Poznámka:** Intenzita barvení pozitivních linií se může lišit. Na výsledek to nemá žádný vliv.  
**Viz příklady výsledků testu StripAssay® na straně 18 (Obr. 3).**

Některé z bodových mutací, které pokrývá test α-Globin StripAssay®, jsou umístěny v několika nukleotidech na genu *α-globinu*. Na proužcích Teststrip jsou tyto mutace reprezentovány běžnou sondou divokého typu, takže 21 mutací je pokryto pouze 9 sondami divokého typu:

Čára	Sonda pro divoký typ	Mutace
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

Vzorky, které jsou heterozygotní pro dvě z těchto mutací (např. Hb Constant Spring + Hb Pakse), budou postrádat běžný divoký typ signálu (viz příklad E, strana 18).

Vzorky, které jsou heterozygotní pro jednu z mutací α1/α2 a jednoduchou nebo dvojitou genovou delecí, budou ve většině případů postrádat příslušný signál divokého typu (viz příklad D, strana 18).

Pro jednoduché a dvojitě delece genů rozlišuje několik sond divokého typu heterozygotní a homozygotní mutantní stav (viz příklady B a C, strana 18):

Delece	Heterozygotní	Homozygotní mutant
-3.7	všechny signály WT přítomny	signály WT 25–31 chybí
-4.2	všechny signály WT přítomny	signály WT 25–31 chybí
-20.5 kb	všechny signály WT přítomny	signály WT 10 a 25–31 chybí
-- MED-I	všechny signály WT přítomny	všechny signály WT chybí
-- SEA	všechny signály WT přítomny	všechny signály WT chybí
-- THAI	všechny signály WT přítomny	všechny signály WT chybí
-- FIL	všechny signály WT přítomny	všechny signály WT chybí

Stejně jako u každého diagnostického testu se mají výsledky testu α-Globin StripAssay® interpretovat v kontextu celkového klinického fenotypu pacienta a dalších lékařských vyšetření, která má lékař k dispozici. Společnost ViennaLab Diagnostics GmbH není odpovědná za jakákoli učiněná klinická rozhodnutí.

## VIII. HODNOCENÍ VÝKONNOSTI

**Správnost** testu α-Globin StripAssay® byla stanovena analýzou 330 předem vytipovaných vzorků genomové DNA. Kromě jednoho vzorku byly výsledky v souladu s referenční metodou (Sangerovo sekvenování, gap-PCR, ARMS-PCR, reverzní dot-blot analýza, vzorky odvozené z EQA). Vzorek s heterozygotní polyA-2 vzniklý ze vzácné rekombinace 3' konců genů *alfa-2* a *pseudoalfa* byl testem StripAssay® označen jako falešně negativní (divoký typ). Test správně detekoval 359 mutantních alel (= 99,7% pozitivní procentuální shoda) a 300 alel divokého typu (= 100% negativní procentuální shoda).

**Přesnost** testu α-Globin StripAssay® byla hodnocena jako variabilita mezi replikáty, pracovníky, dny, termocyklery a hybridizačními zařízeními. Z celkem 62 testů provedených v rámci zkoumaných parametrů se u 61 prokázaly očekávané výsledky genotypování a u jednoho došlo k selhání v důsledku nepřesnosti pipetování templátu DNA. Byly viditelné pouze zanedbatelné rozdíly v intenzitě barvení proužků Teststrip a nebylo pozorováno žádné zbarvení pozadí. Test α-Globin StripAssay® byl validován v systémech AB GeneAmp® PCR System 2700, MJ Research PTC-200 a Eppendorf Mastercycler X50s, které umožňují rychlost zahřátí a chlazení v rozsahu 1,7 až 6,3 °C/s, respektive 1,4 až 3,7 °C/s.

Použití termocyklerů musí být ověřeno uživatelem.

**Analytická specifita** je zajištěna především výběrem primerů specifických pro daný gen a záchytných sond specifických pro alely a také výběrem přísných reakčních podmínek. Analýzou srovnávání sekvencí se všemi sekvencemi publikovanými v genových databázích bylo prověřeno, že primery a sondy neobsahují možné homologie. Tím byla zajištěna detekovatelnost všech relevantních genotypů. Potenciální křížová reaktivita mezi záchytnými sondami byla ověřena syntetickou DNA nesoucí příslušný genový fragment. Nebyla pozorována žádná křížová reaktivita.

**Klinický výkon:** V multicentrické srovnávací studii (Puehringer et al. 2007) bylo testováno celkem 272 vzorků pacientů ze spádové oblasti osmi různých talasemických center po celém světě pomocí testu α-Globin StripAssay® a referenčních metod běžně používaných v těchto laboratořích. Z 544 alel α-globinu divokého typu nebo mutantních alel v kohortě pacientů byly výsledky pro 523 (96,14 %) zcela v souladu mezi metodou StripAssay® a interními metodami.

## IX. INTERFERUJÍCÍ LÁTKY

Bylo testováno pět interferujících látek (hemoglobin, imunoglobulin G, stopy krve, ethanol a EDTA), které mohou být přítomny v preparátech DNA získaných z EDTA krve. Jejich vliv na PCR byl hodnocen na třech purifikovaných vzorcích DNA obohacených různými koncentracemi látek a porovnán s kontrolními vzorky bez jakýchkoli přidaných interferujících látek. Všechny vzorky byly analyzovány v triplicátu.

Konečná koncentrace < 10 μM hemoglobinu, 0,1 μM imunoglobulinu G, < 1 % periferní krve, 1,25 % ethanolu a 0,1 mM EDTA v reakci výkonnost testu StripAssay® neovlivnila.

## **X. OMEZENÍ TESTU**

Test α-Globin StripAssay® je určený výhradně k diagnostice 21 známých mutací uvedených v části III, které jsou zastoupeny záchytnými sondami specifickými pro alely na proužcích Teststrip. Ostatní delece, bodové mutace nebo rekombinace alfa-globinu, které mohou být ve vzorku pacienta přítomné, nelze detekovat. V nejlepším případě může být přehlédnutá bodová mutace lokalizovaná v sekvenci pokrytou záchytnou sondou indikována ztrátou signálu divokého typu na proužku Teststrip, je-li současně přítomna s jednoduchou nebo dvojitou delecí genů nebo v homozygotním stavu.

Vzácné nebo individuální varianty v místech vazby primerů a sond stejně jako konverze genů mohou vést k selhání amplifikace a k chybějícím signálům na proužcích Teststrip.

Test α-Globin StripAssay® neumožňuje rozlišit heterozygotní a homozygotní mutantní stav triplikace genu anti-3.7 (anti-3.7/αα a anti-3.7/anti-3.7).

V přítomnosti velkých delecí genů nedetekovatelných testem se jednoduché delece genu (-3.7 nebo -4.2) a bodové mutace jeví jako homozygotní.

Test α-Globin StripAssay® se nesmí používat k účelům prenatální diagnostiky ani preimplantační genetické diagnostiky. Test nebyl validován u vzorků získaných z odběru choriových klků, plodové tekutiny a pupečnickové krve.

Test α-Globin StripAssay® smí používat pouze profesionální laboratorní pracovníci.

## **XI. HLEDISKA KVALITY**

- K získání spolehlivých výsledků je nutné důkladně pochopit postup uvedený zde, znát standardní laboratorní techniky a mít vhodné vybavení.
- Soupravu StripAssay® nepoužívejte po uplynutí data expirace.
- Po prvním otevření primárního obalu jsou činidla testu StripAssay® stabilní až do data expirace vytištěného na vnějším štítku soupravy. Musí se ale řádně uchovávat při teplotě 2 °C až 8 °C.
- Aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci a křížové kontaminaci činidel nebo vzorků, používejte sterilní jednorázové pipetové špičky. Nezaměňujte víčka lahví.
- Pouze k jednorázovému použití.

## **XII. BEZPEČNOST**

- Ve vyhrazených pracovních oblastech nepijte, nejezte, nekuřte ani nepoužívejte kosmetiku. Při manipulaci se vzorky a činidly soupravy používejte laboratorní pláště a jednorázové rukavice. Poté si důkladně umyjte ruce.
- Se vzorky zacházejte tak, jako by mohly přenášet infekční agens. Všechny materiály a povrchy, které byly v kontaktu se vzorky, důkladně očistěte a vydezinfikujte. Veškerý odpad související s klinickými vzorky vyhoďte do nádoby na biologický odpad.
- Dávejte pozor, aby se přípravky DNAT a Color Developer nedostaly do kontaktu s kůží, očima nebo sliznicemi. Pokud ke kontaktu dojde, okamžitě omyjte zasaženou část velkým množstvím vody. Pokud dojde k rozlítí, před utřením do sucha zřeďte vodou.
- Dodržujte všechny místní a federální bezpečnostní a environmentální předpisy, které se na používání testu mohou vztahovat.

### **XIII. TECHNICKÁ PODPORA**

Technickou podporu najdete:

- u místního distributora společnosti ViennaLab Diagnostics ([www.viennalab.com/distribution](http://www.viennalab.com/distribution)),
- ve výukových videích ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support)),
- v příručce k testu StripAssay® ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support)),
- v průvodci řešením problémů s testem StripAssay® ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support)),
- na e-mailové adrese [techhelp@viennalab.com](mailto:techhelp@viennalab.com).












### **XIV. LITERATURA**

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

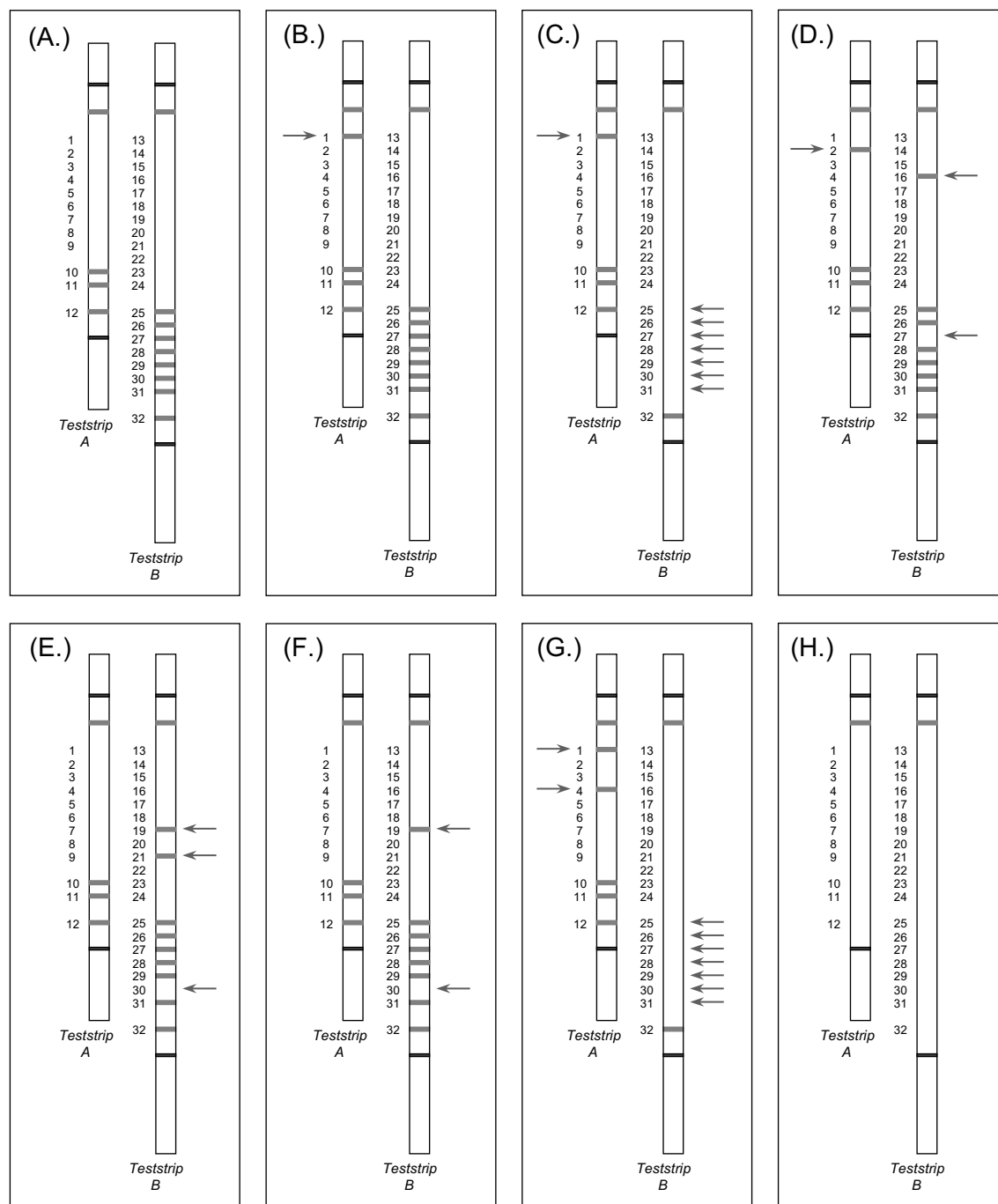
### **XV. ZPĚTNÁ VAZBA VÝROBCI**

Jakékoli vážné problémy, ke kterým v souvislosti s testem StripAssay® dojde, se musí hlásit kompetentnímu orgánu dané země a výrobci.

## XVI. SYMBOLY

	Katalogové číslo
	Kód šarže
	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	V souladu s evropským nařízením o IVD 2017/746
0123	Identifikační číslo notifikovaného subjektu
	Dostačující pro <n> testů
	Teplotní limity pro skladování
	Použitelné do
	Výstraha
	Výrobce
	Datum výroby
	Přečtěte si návod k použití

**XVII. PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ TESTU**




**Obr. 3: Příklad výsledků získaných pomocí testu α-Globin StripAssay®**

- (A.) normální ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ )
- (B.) -3.7 heterozygotní (-3.7/ $\alpha\alpha$ )
- (C.) -3.7 homozygotní (-3.7/-3.7)
- (D.) -4.2 + IVS1-5nt heterozygotní (-4.2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse heterozygotní (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring homozygotní (HbCS/HbCS)
- (G.) -3.7 + --MED-I heterozygotní (-3.7/--MED-I)
- (H.) negativní kontrola nebo selhání PCR

**POZNÁMKY**

## XVIII. SOUVISEJÍCÍ PRODUKTY

<b>REF</b>		
4-125	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> AZE1	20 testů
4-126	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> AZE2	20 testů
4-130	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> MED	20 testů
4-140	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> IME	20 testů
4-150	$\beta$ -Globin StripAssay <sup>®</sup> SEA	20 testů
4-160	$\alpha$ -Globin StripAssay <sup>®</sup>	10 testů
4-170	$\beta$ -Thal Modifier StripAssay <sup>®</sup>	20 testů
CS-012	StripAssay <sup>®</sup> Detection Reagents	20 testů
CS-017	StripAssay <sup>®</sup> Detection Reagents 48	48 testů
2-014	GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System	100 extrakcí
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 extrakcí
6-080	Typing Trays	5

**Distributor:**

 **Výrobce:**

 **ViennaLab<sup>®</sup>**

**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)