

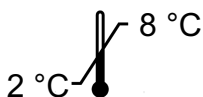
α -Globin StripAssay[®]

Gebruiksaanwijzing

REF



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



IVD



Versie: rev 1.3 / Nederlands
eIFU en andere talen beschikbaar op
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

INHOUD

I. BEOOGD DOEL 4

II. ACHTERGROND 4

III. METHODOLOGIE 4

IV. KITONDERDELEN 6

V. BENODIGDE MATERIALEN, MAAR NIET MEEGELEVERD 7

VI. TESTPROCEDURE 8

VII. INTERPRETATIE VAN RESULTATEN 12

VIII. PRESTATIE-EVALUATIE 14

IX. INTERFERERENDE STOFFEN 14

X. BEPERKINGEN VAN DE ASSAY 15

XI. KWALITEITSOVERWEGINGEN 15

XII. VEILIGHEID 15

XIII. TECHNISCHE ONDERSTEUNING 16

XIV. REFERENTIES 16

XV. FEEDBACK AAN DE FABRIKANT 16

XVI. SYMBOLEN 17

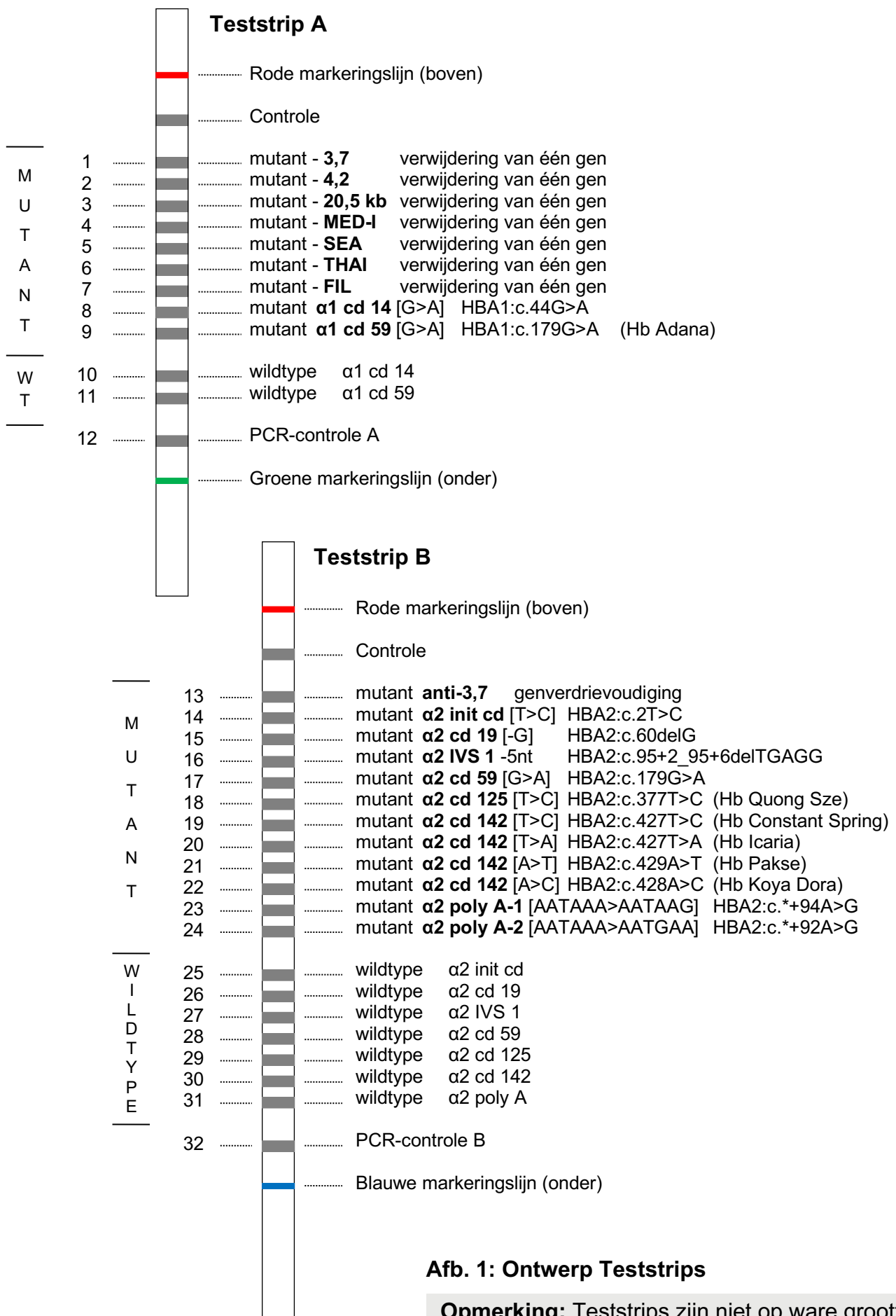
XVII. VOORBEELDEN VAN TESTRESULTATEN 18

XVIII. AANVERWANTE PRODUCTEN 20

REVISIEGESCHIEDENIS:

versie	datum	beschrijving
rev 1.1	2022-02	CE-markering met identificatienummer van aangemelde instantie; link naar SSP; verklaring van monsterbron en handmatig/semi-automatisch gebruik (I); specificatie van kitonderdelen (IV); klinische prestatiegegevens (VIII)
rev 1.2	2022-05	Datum van uitgave, verwijzing naar elektronische IFU (eIFU), inclusief Iran (II)
rev 1.3	2022-11	Verbeterde lay-out en resolutie van afbeeldingen

Samenvatting van de veiligheid en prestaties (SSP, summary of safety and performance) van de StripAssay® kan worden opgevraagd via de European Database on Medical Devices (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> of bij de fabrikant.



Afb. 1: Ontwerp Teststrips

Opmerking: Teststrips zijn niet op ware grootte getekend en mogen niet worden gebruikt voor het interpreteren van resultaten!

I. BEOOGD DOEL

De α-Globin StripAssay® is een kwalitatieve genetische test voor de gerichte analyse van 21 veel voorkomende grote deleties en puntmutaties van de *hemoglobine-subeenheid alfa 1* (*HBA1*, *hemoglobin subunit alpha 1*) en *alfa 2* (*HBA2*, *hemoglobin subunit alpha 2*)-genen in DNA geïsoleerd uit menselijk perifeer bloed. De test wordt gebruikt als hulpmiddel om een vermoedelijke diagnose van alfa-thalassemie (alfa-thal) genetisch te bevestigen. Bovendien kan de test worden gebruikt voor het screenen van de status van thalassemie-drager bij de familieleden van de patiënt en de algemene bevolking. De StripAssay® kan handmatig of halfautomatisch worden uitgevoerd.

Voor humaan *in vitro* diagnostisch gebruik.

II. ACHTERGROND

Mutaties in de *alfaglobinegenen* zijn de genetische oorzaak van alfatalassemie. Dat is een autosomaal recessief overervende aandoening die wordt gekenmerkt door onvoldoende of afwezige productie van alfaglobineketens, wat leidt tot een variabel klinisch beeld afhankelijk van het aantal aangetaste allelen.

Patiënten met karakteristieke hematologische waarden van microcytaire anemie en overeenkomstige hemoglobinepatronen, familieleden van een getroffen patiënt, toekomstige ouders, evenals individuen uit populaties met een hoog risico (bijv. Middellandse Zeegebied, Afrika, Arabisch schiereiland, Iran, India en Zuidoost-Azië) die het risico lopen drager te zijn van alfa-thalassemie moeten worden getest.

III. METHODOLOGIE

De α-Globin StripAssay® is gebaseerd op polymerasekettingreactie (PCR, polymerase chain reaction) en omgekeerde hybridisatie. De procedure bestaat uit drie stappen: (1) DNA-isolatie, (2) PCR-amplificatie met behulp van gebiotinyleerde primers, (3) hybridisatie van amplificatieproducten op een Teststrip met allelspecifieke oligonucleotideprobes, geïmmobiliseerd als een reeks parallelle lijnen (Afb. 1). Gebonden gebiotinyleerde sequenties worden gedetecteerd met streptavidine-alkalische fosfatase en kleursubstraten.

De α-Globin StripAssay® detecteert de volgende mutaties in de *alfaglobine*genlocus:

naam legacy	HGVS-nomenclatuur	RefSNP
1 -3,7 kb	NG_000006.1:g.34164_37967del3804	--
2 -4,2 kb	n.v.t.	--
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 genverdrievoudiging	n.v.t.	--
9 cd 14 [G>A]	HBA1:c.44G>A	rs63750090
10 cd 59 [G>A] Hb Adana	HBA1:c.179G>A	rs28928878
11 initiatie-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

Referentiesequentie (RefSeq, Reference Sequence):

NG_000006.1



NM_000558.3 (HBA1)

NM_000517.4 (HBA2)

De test kan handmatig of halfautomatisch worden uitgevoerd met instrumenten die zijn ontworpen voor automatisering van de verwerking van Teststrips (zie hoofdstuk VI. 3.4).

IV. KITONDERDELEN

REF

	4-160	4-160-A	4-160 -TRIAL
1a. Amplification Mix A1 (<i>gele dop</i>)	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1b. Amplification Mix A2 (<i>witte dop</i>)	250 µl	2x 250 µl	250 µl
1c. Amplification Mix B (<i>groene dop</i>)	250 µl	2x 250 µl	250 µl
2. Taq Dilution Buffer (<i>transparante dop</i>)	500 µl	500 µl	500 µl
3. HS-Taq DNA Polymerase (5 E/µl) (<i>rode dop</i>)	125 E	175 E	125 E
4. DNAT (<i>blauwe dop</i>)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Waarschuwing: DNAT bevat 1,6% NaOH H315: Veroorzaakt huidirritatie H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie P280: Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming P337 + P313: Als oogirritatie aanhoudt: zoek medisch advies/zorg</p>			
5. Typing Trays	3	---	2
6a. Teststrips A (<i>zwarte dop</i>)	10	24	5
6b. Teststrips B (<i>witte dop</i>)	10	24	5
7. Hybridization Buffer (<i>witte dop</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
8. Wash Solution A (<i>witte dop</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
9. Conjugate Solution (<i>transparante dop</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
10. Wash Solution B (<i>transparante dop</i>)	80 ml	200 ml	80 ml
11. Color Developer (<i>bruine dop</i>)	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Waarschuwing: Color Developer bevat ≤0,4% maleïnezuur H317: Kan een allergische huidreactie veroorzaken P280: Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming P302 + P352: Indien op de huid: wassen met veel water P333 + P313: Indien huidirritatie of huiduitslag optreedt: zoek medisch advies/hulp</p>			
12. Gebruiksaanwijzing	1	1	1
13. Collector™ Sheet	1	3	1

Opmerking: Bewaar alle reagentia bij 2 °C tot 8 °C wanneer u ze niet gebruikt!

naam van component	samenstelling
Amplification Mix A1/A2/B	sequentiespecifieke 5'-biotine-gelabelde oligonucleotiden, een equimolair mengsel van deoxyribonucleotidtrifosfaten (dATP, dCTP, dGTP en dTTP), MgCl ₂ , ammoniumsulfaatbuffer, betaïne, 0,05% natriumazide
Taq Dilution Buffer	buffer voor HS-Taq DNA-polymerase, inclusief KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ en MgCl ₂ , 0,05% natriumazide
HS-Taq DNA Polymerase (5 E/µl)	hot-start Taq DNA polymerase in een concentratie van 5 E/µl
DNAT	basische oplossing met 1,6% natriumhydroxide en een blauwe kleurstof die een verandering van pH aangeeft
Typing Trays	plastic tray met acht wells

naam van component	samenstelling
Teststrips A/B	allelspecifieke oligonucleotideprobes, controle op positieve PCR-reactie en een hybridisatiecontrole geïmmobiliseerd als een reeks parallelle lijnen op een door polyester ondersteund membraan, omlijst door een rode lijn aan de bovenkant en een groene lijn (Teststrip A) of blauwe lijn (Teststrip B) aan de onderkant
Hybridization Buffer	fosfaatbuffer met <2% detergens
Wash Solution A	citraatbuffer met <1% detergens
Conjugate Solution	streptavidine geconjugeerde alkalische fosfatase, verdund in een buffer op basis van zoutoplossing met 0,05% natriumazide
Wash Solution B	trisbuffer met <2% detergens en 0,05% natriumazide
Color Developer	kleursubstraat voor de alkalische fosfatase bevat nitroblauwtetrazolium (NBT, nitro blue tetrazolium) en 5-broom-4-chloor-3-indolylfosfaat (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)
Gebruiksaanwijzing	bedrukt papier
Collector™ Sheet	bedrukt papier

V. BENODIGDE MATERIALEN, MAAR NIET MEEGELEVERD

Naast de standaard laboratoriumapparatuur voor moleculaire biologie is het volgende nodig:

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- Thermocycler met verwarmd deksel (voor specificatie van afregelsnelheid, zie hoofdstuk VIII)
- Waterbad met schudplatform, deksel en instelbare temperatuur (45 °C ± 1 °C)
- Schudapparaat (rocker of rondschudapparaat)

Optioneel:

- Vacuüm afzuigapparaat
- Thermoshaker voor microtiterplaatformaat met deksel en instelbare temperatuur (45 °C ± 1 °C), bijv. PST-60 HL (Biosan) of gelijkwaardig apparaat
- Instrument voor geautomatiseerde hybridisatie, instelbaar op het tijd-temperatuurprofiel zoals beschreven in hoofdstuk VI. 3.4, bijv. DYNABLOT Heat (Dynex) of een gelijkwaardig apparaat
- Apparatuur voor agarosegel-elektroforese (voor controle van amplificatieproducten)

VI. TESTPROCEDURE

1. Monstervoorbereiding

Monster: Gebruik vers of ingevroren bloed met EDTA-antistollingsmiddel. Bloed met heparine of citraat is niet getest. Bewaar bloed vóór gebruik niet langer dan 3 dagen bij kamertemperatuur of langer dan 1 week bij 2 °C tot 8 °C. Bloed dat langer dan een jaar ingevroren is geweest of meer dan drie vries-dooicycli heeft doorlopen mag niet worden gebruikt. Voor monsterafname en transport volgt u de gebruiksaanwijzingen van het EDTA-bloedafnamebuisje en de algemene aanbevelingen voor bloedafname.

DNA-extractie: Breng de bloedmonsters op kamertemperatuur. Meng goed door de bloedafnamebuisjes enkele keren voorzichtig om te keren. Herhaal het mengen elke keer voordat u een hoeveelheid bloed afneemt. Aanbevolen wordt om de **Spin Micro DNA Extraction Kit** (REF 2-020, ViennaLab) te gebruiken voor DNA-isolatie uit volbloed. Gebruik van andere DNA-isolatiemethoden met de α-Globin StripAssay® is niet gevalideerd. Als andere DNA-extractiesystemen worden gebruikt, moeten de concentratie en zuiverheid van het DNA binnen een bereik van respectievelijk 2 tot 10 ng/μl en een OD_{A260/280}-verhouding van 1,7 tot 2,0 liggen. Hogere DNA-concentraties moeten vóór de PCR-invoer tot het aanbevolen bereik worden verdund.

Opmerking: DNA dat PCR-remmers en/of magnetische deeltjes bevat die zijn afgeleid van een op kralen gebaseerd extractiesysteem kan ongevoelig zijn voor amplificatie en moet worden verdund tot 2 ng/μl met behulp van water van PCR-kwaliteit.

Het geëxtraheerde DNA moet worden bewaard bij 2 °C tot 8 °C (maximaal een week) of bij -30 °C tot -15 °C (voor lange termijn) totdat de analyse wordt uitgevoerd.

2. In vitro amplificatie (PCR) – 3 afzonderlijke reacties per monster

Belangrijk: Bewaar alle PCR-reagentia en DNA-sjablonen in de koelkast.

- Bereid elke keer vers een passende hoeveelheid werkoplossing (1:15, eindconcentratie 0,33 E/μl) **HS-Taq DNA Polymerase** (5 E/μl, rode dop) in **Taq Dilution Buffer** (transparante dop) voor het aantal te analyseren monsters plus de **controle zonder sjabloon** (NTC, no-template control).

component	per reactie	bijv. 10 reacties
HS-Taq DNA Polymerase (5 E/μl)	0,33 μl	3,3 μl
Taq Dilution Buffer	4,67 μl	46,7 μl
werkende oplossing	5 μl	50 μl

- Bereid voor elk monster dat moet worden geamplificeerd drie reactiebuisjes voor. Plaats de buisjes op ijs.
- Bereid voor elk monster 3 uiteindelijke PCR-reactiemengsels (A1, A2, B) op ijs voor:
 - A1: **15 μl Amplification Mix A1** (gele dop)
5 μl verdund HS-Taq DNA Polymerase (1,66 E)
5 μl DNA-sjabloon
 - A2: **15 μl Amplification Mix A2** (witte dop)
5 μl verdund HS-Taq DNA Polymerase (1,66 E)
5 μl DNA-sjabloon
 - B: **15 μl Amplification Mix B** (groene dop)
5 μl verdund HS-Taq DNA Polymerase (1,66 E)
5 μl DNA-sjabloon

Opmerking: Het wordt aanbevolen om voor alle monsters een mastermix te bereiden die Amplification Mix en verdund HS-Taq DNA-polymerase bevat. Pipetteer eerst 20 μl mastermix in elk PCR-buisje en voeg dan DNA-sjabloon toe. Voeg in elke run een controle zonder sjabloon toe door water van PCR-kwaliteit te gebruiken in plaats van DNA (of bij voorkeur de negatieve controle van uw DNA-extractie).

Bereid in het algemeen werkoplossingen/mastermix voor met een volumeoverschot van 10% om onnauwkeurigheden bij het pipetteren te compenseren.

- Sluit de buisjes goed af. Verwarm de thermocycler voor op 95 °C.
- Plaats reactiebuisjes en voer het volgende thermocyclingprogramma uit:
 - pre-PCR: 95 °C/5 min.**
 - thermocycling: 97°C/40 sec. - 64°C/40 sec. - 72 °C/01:30 min. (3 cycli)**
97°C/40 sec. - 58°C/40 sec. - 72 °C/01:30 min. (37 cycli)
 - definitieve extensie: 72°C/5 min.**
- Bewaar amplificatieproducten op ijs of bij 2 °C tot 8 °C voor verder gebruik.

Optioneel: Analyseer amplificatieproducten door gelelektroforese (bijv. 3% agarosegel).

Fragmentlengtes: 881 bp; deleties: 1783 bp (A1)
 296 bp; deleties: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 bp (A2)
 302, 864 bp; deleties: 1772 bp (B)

3. Verwerking van Teststrips

3.1. Hybridisatie (handmatig) – 2 Teststrips per monster (45 °C, schuddend waterbad)

Belangrijk: Stel het waterniveau van het waterbad in op ca. ½ van de hoogte van de Typing Tray. Verwarm het waterbad tot precies 45 °C. Controleer de watertemperatuur met een gekalibreerde thermometer. Verwarm Hybridization Buffer en Wash Solution A voor tot 45 °C. Zorg ervoor dat alle precipitaten die bij 2 °C tot 8 °C zijn gevormd volledig worden opgelost. Laat Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B en Color Developer op kamertemperatuur komen. Bereid Typing Tray(s) voor.

Verwijder voor elk monster één Teststrip A en één Teststrip B met een schoon pincet. Raak Teststrips alleen aan met ongepoederde handschoenen! Label Teststrips buiten de markeerlijnen met een potlood (geen balpennen, markers etc.).

Voor alle **Teststrips A** (één baan per monster):

- Pipetteer **20 µl DNAT** (blauwe dop) in de benedenhoek van elke baan die in de Typing Trays moet worden gebruikt.
- Voeg **10 µl amplificatieproduct A1** in de overeenkomstige druppel DNAT toe.
- Voeg **10 µl amplificatieproduct A2** in dezelfde druppel toe.
- Meng grondig met een pipet. (De oplossing blijft blauw.)
- Laat het buisje **5 minuten** op kamertemperatuur staan.
- Voeg **1 ml Hybridization Buffer** (voorverwarmd tot 45 °C) in elke baan toe. Schud de tray voorzichtig. (De blauwe kleur verdwijnt.)
- Plaats **Teststrip A** of **Teststrip B** met de gemarkeerde kant naar boven (lijnen zichtbaar!) in de respectievelijke banen. Volledig onderdompelen.
- Incubeer **30 minuten** op **45 °C** op het schudplatform van het waterbad.

Voor alle **Teststrips B** (één baan per monster):

- Pipetteer **10 µl DNAT** (blauwe dop) in de benedenhoek van elke baan die in de Typing Trays moet worden gebruikt.
- Voeg **10 µl amplificatieproduct B** in de overeenkomstige druppel DNAT toe.
- Meng grondig met een pipet. (De oplossing blijft blauw.)

Stel een gematigde schudfrequentie in (ca. 50 tpm) om morsen te voorkomen. Houd het deksel van het waterbad gesloten om temperatuurschommelingen te voorkomen.

- Verwijder aan het einde van de incubatie de hybridisatieoplossingen door vacuümzuigen of pipetteren.

Ga onmiddellijk verder. Zorg ervoor dat Teststrips tijdens de gehele procedure niet drooglopen.

3.2. Stringent Wash (45 °C, waterbad schudden)

- Voeg **1 ml Wash Solution A** (voorverwarmd tot 45 °C) toe. Kort spoelen (10 sec.). Verwijder vloeistoffen door vacuümafzuiging of pipetteren.
- Voeg **1 ml Wash Solution A** (45 °C) toe.
- Incubeer **15 minuten** op **45 °C** in het schuddende waterbad. Verwijder vloeistoffen door vacuümafzuiging of pipetteren.
- Voeg **1 ml Wash Solution A** (45 °C) toe.
- Incubeer **15 minuten** op **45 °C** in het schuddende waterbad. Verwijder vloeistoffen door vacuümafzuiging of pipetteren.

3.3. Colorimetric Detection (kamertemperatuur, 22 °C ± 3 °C)

- Voeg **1 ml Conjugate Solution** toe.
- Incubeer **15 minuten** op **kamertemperatuur** op een rocker of een rondschildapparaat. Verwijder vloeistoffen door vacuümafzuiging of pipetteren.
- Voeg **1 ml Wash Solution B** toe. Kort spoelen (10 sec.). Verwijder vloeistoffen door vacuümafzuiging of pipetteren.
- Voeg **1 ml Wash Solution B** toe.
- Incubeer **5 minuten** op **kamertemperatuur** op een rocker of een rondschildapparaat. Verwijder vloeistoffen door vacuümafzuiging of pipetteren.
- Voeg **1 ml Wash Solution B** toe.
- Incubeer **5 minuten** op **kamertemperatuur** op een rocker of een rondschildapparaat. Verwijder vloeistoffen door vacuümafzuiging of pipetteren.
- Voeg **1 ml Color Developer** toe.
- Incubeer **15 minuten** op **kamertemperatuur** in het donker op een rocker of een rondschildapparaat. Bij een positieve reactie verschijnt een paarse kleuring.
- Was de Teststrips meerdere malen met gedestilleerd water. Laat de strips in het donker op absorberend papier drogen.

Stel de Teststrips na de Color Developer niet bloot aan fel licht.

3.4. Hybridisatie (geautomatiseerd) - optioneel in plaats van waterbad en shaker

Een instrument voor de geautomatiseerde verwerking van Teststrips moet aan de volgende eisen voldoen:

- Programmeerbaar temperatuur- en tijdprofiel volgens hoofdstuk 3.1 tot 3.3 van de StripAssay®-procedure.
- Geïntegreerd voorverwarmingsstation voor Hybridization Buffer en Wash Solution A.
- Temperatuurregeling van trays tijdens hybridisatie- en Stringent Wash-stappen bij 45 °C ± 1 °C.
- Actief koelsysteem van de tray om te zorgen voor een snelle temperatuurdaling voor Colorimetric Detection-stappen bij kamertemperatuur.
- Schudmogelijkheid voor tray.
- Verwarmd deksel voor de tray om verdamping van reagentia tijdens de incubatie te voorkomen.
- Dosering van gedefinieerde reagensvolumes.
- Aspiratie van reagentia.
- Afhankelijk van het gebruikte instrument en het aantal monsters dat in één run wordt verwerkt zijn mogelijk extra reagentia nodig. Er zijn aparte StripAssay® Detection Reagents verkrijgbaar voor 20 tests (REF CS-012) en 48 tests (REF CS-017).

VII. INTERPRETATIE VAN RESULTATEN

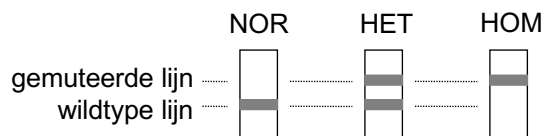
Het genotype van een monster wordt bepaald aan de hand van de corresponderende Teststrips A en B met behulp van het meegeleverde Collector™ Sheet. Plaats beide verwerkte Teststrips in de daarvoor bestemde velden, lijn deze uit met de schematekening met behulp van de rode markeringslijn (boven) en de groene markeringslijn (onder) en bevestig deze met plakband.

Een positieve reactie van de bovenste controlelijn duidt op de juiste werking van Conjugate Solution en Color Developer. Deze lijn moet altijd positief kleuren.

Een positieve reactie van de PCR-controle A- en PCR-controle B-lijnen duidt op de aanwezigheid van de juiste amplificatieproducten. Deze lijnen moeten altijd positief kleuren, behalve de controle zonder sjabloon, die water bevat in plaats van de DNA-sjabloon (zie voorbeeld H, pagina 18).

Het ontbreken van PCR-controles op Teststrips kan duiden op valse hybridisatie van Mix A1/A2-amplificatieproducten met Teststrip B en Mix B-amplificatieproducten met Teststrip A. Herhaal de test.

Voor elke polymorfe positie moet een van de volgende kleuringpatronen (Afb. 2) worden verkregen:



Afb. 2: Genotypen – vlekkenpatronen op de Teststrip

	wildtype lijn	gemuteerde lijn	genotype
NOR	positief	negatief	normaal
HET	positief	positief	heterozygoot
HOM	negatief	positief	homozygote mutant

Opmerking: De kleurintensiteit van positieve lijnen kan variëren. Dit is niet van belang voor het resultaat.

Zie voorbeelden van StripAssay®-resultaten op pagina 18 (Afb. 3).

Sommige van de puntmutaties die door de α-Globin StripAssay® worden gedekt bevinden zich binnen een paar nucleotiden van het α -gen. Op de Teststrips worden deze weergegeven door een gemeenschappelijke wildtype-probe, zodat de 21 mutaties slechts door 9 wildtype-probes worden gedekt:

lijn	wildtype-probe	mutatie
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

Monsters die samengesteld heterozygoot zijn voor twee van deze mutaties (bijv. Hb Constant Spring + Hb Pakse) zullen het gebruikelijke wildtypesignaal missen (zie voorbeeld E, pagina 18).

Monsters die samengesteld heterozygoot zijn voor een van de α1/α2-mutaties, en een enkele of dubbele gendeletie, zullen in de meeste gevallen het respectieve wildtypesignaal missen (zie voorbeeld D, pagina 18).

Voor deleties van enkele en dubbele genen maken verschillende wildtype-probes onderscheid tussen de heterozygote en de homozygote mutantstatus (zie voorbeelden B en C, pagina 18):

deletie	heterozygoot	homozygote mutant
- 3,7	alle WT-signalen aanwezig	WT signalen 25-31 afwezig
- 4,2	alle WT-signalen aanwezig	WT signalen 25-31 afwezig
- 20,5 kb	alle WT-signalen aanwezig	WT signalen 10 en 25-31 afwezig
-- MED-I	alle WT-signalen aanwezig	alle WT-signalen afwezig
-- SEA	alle WT-signalen aanwezig	alle WT-signalen afwezig
-- THAI	alle WT-signalen aanwezig	alle WT-signalen afwezig
-- FIL	alle WT-signalen aanwezig	alle WT-signalen afwezig

Zoals bij elke diagnostische test moeten de resultaten van de α-Globin StripAssay® worden geïnterpreteerd in de context van het algehele klinische fenotype van de patiënt en andere medische onderzoeken waarover de arts beschikt. ViennaLab Diagnostics GmbH is niet verantwoordelijk voor eventuele klinische beslissingen die worden genomen.

VIII. PRESTATIE-EVALUATIE

De **nauwkeurigheid** van de α-Globin StripAssay® werd bepaald door 330 vooraf getypeerde genomische DNA-monsters te analyseren. Op één monster na kwamen de resultaten overeen met de referentiemethode (Sanger-sequentie, gap-PCR, ARMS-PCR, reverse dot-blot analysis, EQA-afgeleide monsters). Een heterozygoot polyA-2-monster, voortgekomen uit een zeldzame recombinatie van de 3'-uiteinden van de *alfa-2*- en *pseudo-alfa*-genen, werd door de StripAssay® als vals-negatief (wildtype) getypeerd. Met de test werden 359 mutante allelen (= 99,7% positieve procentovereenkomst) en 300 wildtype allelen (= 100% negatieve procentovereenkomst) correct gedetecteerd.

De nauwkeurigheid van de α-Globin StripAssay® werd beoordeeld als variabiliteit tussen replicaten, operators, dagen, thermocyclers en hybridisatie-apparaten. In totaal werden 62 tests uitgevoerd met de onderzochte parameters. 61 daarvan leverden de verwachte genotyperingsresultaten op en één monster mislukte door onnauwkeurigheid bij het pipetteren van sjabloon-DNA. Er waren slechts verwaarloosbare verschillen in kleurintensiteit van Teststrips zichtbaar en er werd geen achtergrondkleuring waargenomen. De α-Globin StripAssay® werd gevalideerd op het AB GeneAmp® PCR System 2700, MJ Research PTC-200 en Eppendorf Mastercycler X50s, die een verwarmings- en koelsnelheid van respectievelijk 1,7 tot 6,3 °C/sec en 1,4 tot 3,7 °C/sec vertegenwoordigen.

Het gebruik van andere thermocyclers moet door de gebruiker worden geverifieerd.

Analytische specificiteit wordt in de eerste plaats gegarandeerd door de selectie van genspecifieke primers en allelspecifieke capture-probes, evenals door de selectie van stringente reactieomstandigheden. De primers en probes werden gecontroleerd op mogelijke homologieën met alle sequenties die gepubliceerd zijn in genendatabases door sequentievergelijkinganalyse. Daarbij is de detecteerbaarheid van alle relevante genotypen gegarandeerd. Mogelijke kruisreactiviteit tussen capture-probes werd geverifieerd met synthetisch DNA dat het respectieve genfragment bevatte. Er werd geen kruisreactiviteit waargenomen.

Klinische prestaties: In een vergelijkend onderzoek in meerdere centra (Puehringer et al. 2007), zijn in totaal 272 patiëntmonsters uit het verzorgingsgebied van acht verschillende thalassemiecentra wereldwijd getest met de α-Globin StripAssay® en de referentiemethoden die routinematig in deze laboratoria worden gebruikt. Van de 544 wild-type of mutante α-globine allelen in het patiëntcohort waren de resultaten voor 523 (96,14%) volledig concordant tussen de StripAssay® en de interne methoden.

IX. INTERFERERENDE STOFFEN

Er zijn vijf interfererende stoffen (hemoglobine, immunoglobine G, sporen van bloed, ethanol en EDTA) getest die mogelijk aanwezig zijn in DNA-preparaten afgeleid van EDTA-bloed. Hun effecten op PCR werden geëvalueerd in drie gezuiverde DNA-monsters waaraan verschillende concentraties stoffen waren toegevoegd en vergeleken met hun controles zonder toevoeging van interfererende stoffen. Alle monsters werden in drievoud geanalyseerd.

Een eindconcentratie van <10 µM hemoglobine, 0,1 µM immunoglobuline G, <1% perifeer bloed, 1,25% ethanol of 0,1 mM EDTA in de reactie had geen invloed op de prestaties van StripAssay®.

X. BEPERKINGEN VAN DE ASSAY

De α-Globin StripAssay® is exclusief ontworpen voor de diagnose van 21 veelvoorkomende mutaties zoals vermeld in hoofdstuk III, die worden weergegeven door allelspecifieke capture-probes op de Teststrips. Andere alfavoglobine-deleties, puntmutaties of recombinaties die mogelijk aanwezig zijn in het monster van een patiënt kunnen niet worden gedetecteerd. In het beste geval kan een verwaarloosde puntmutatie die zich binnen de sequentie bevindt die door een capture-probe wordt bepaald, worden aangegeven door het verlies van wildtypesignaal op de Teststrip wanneer deze gelijktijdig aanwezig is met een enkele of dubbele gendeletie of in homozygote toestand.

Zeldzame of particuliere varianten binnen bindingsplaatsen van primers en probes, evenals genconversies, kunnen leiden tot mislukken van de amplificatie en ontbrekende signalen op Teststrips.

De α-Globin StripAssay® maakt het niet mogelijk om onderscheid te maken tussen de heterozygote en de homozygote mutantstatus van de anti-3,7 gentryplicatie (anti-3,7/αα en anti-3,7/anti-3,7).

In de aanwezigheid van grote gendeleties die niet door de test kunnen worden gedetecteerd, verschijnen deleties van één gen (-3,7 of -4,2) en puntmutaties als homozygoot.

De α-Globin StripAssay® mag niet worden gebruikt voor prenatale diagnose of genetische diagnose vóór implantatie. De test is niet gevalideerd op monsters afkomstig van vlokkentest, vruchtwater of navelstrengbloed.

De α-Globin StripAssay® is uitsluitend bedoeld voor professioneel gebruik in laboratoria.

XI. KWALITEITSOVERWEGINGEN

- Om betrouwbare resultaten te verkrijgen, zijn een grondig begrip van de hier beschreven procedure, evenals standaard laboratoriumtechnieken en geschikte apparatuur vereist.
- Gebruik StripAssay®-kits niet na de vervaldatum.
- Na de eerste opening van de primaire verpakking zijn StripAssay®-reagentia stabiel tot de vervaldatum die op het buitenste etiket van de kit staat vermeld, mits op de juiste manier bewaard bij 2 °C tot 8 °C.
- Gebruik steriele wegwerppipettips met filters om microbiële besmetting en kruisbesmetting van reagentia of monsters te voorkomen. Verwissel de flessendoppen niet.
- Alleen voor eenmalig gebruik.

XII. VEILIGHEID

- Drink, eet, rook niet en breng geen cosmetica aan in de aangewezen werkruimtes. Draag laboratoriumjassen en wegwerphandschoenen bij het hanteren van monsters en kitreagentia. Was daarna de handen grondig.
- Behandel monsters alsof ze besmettelijke agentia kunnen overdragen. Reinig en desinfecteer grondig alle materialen en oppervlakken die in contact zijn geweest met monsters. Gooi al het afval van klinische monsters weg in een container voor biologisch gevaarlijk afval.
- Vermijd contact van DNAT en Color Developer met de huid, ogen of slijmvliezen. Als er toch contact optreedt, was dan onmiddellijk met grote hoeveelheden water. Indien gemorst, verdunnen met water voordat u het droogveegt.
- Houd u aan alle lokale en federale veiligheids- en milieuvoorschriften die van toepassing kunnen zijn.

XIII. TECHNISCHE ONDERSTEUNING

Technische ondersteuning kan worden verkregen door:

- de plaatselijke distributeur van ViennaLab Diagnostics (www.viennalab.com/distribution)
- Video-handleidingen (www.viennalab.com/support)
- De handleiding van StripAssay[®] (www.viennalab.com/support)
- de Troubleshooting Guide (Gids voor probleemoplossing) van StripAssay[®] (www.viennalab.com/support)
- Door contact op te nemen met techhelp@viennalab.com













XIV. REFERENTIES

- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man (www.omim.org)
- HbVar-database (<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

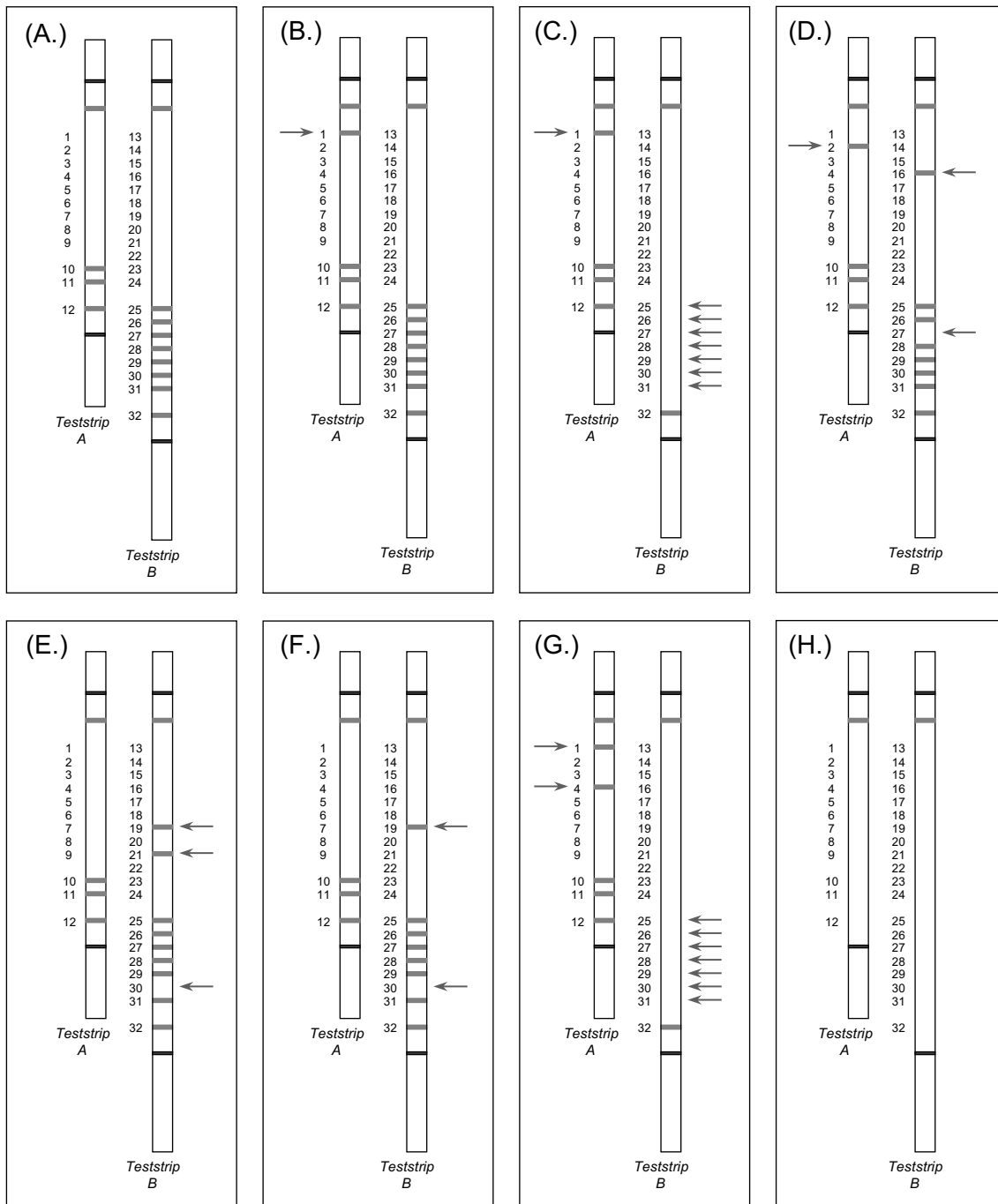
XV. FEEDBACK AAN DE FABRIKANT

Elk ernstig incident dat zich heeft voorgedaan met betrekking tot de StripAssay[®] moet worden gerapporteerd aan de bevoegde autoriteit van het land en aan de fabrikant.

XVI. SYMBOLEN

	Catalogusnummer
	Batchcode
	Medisch hulpmiddel voor <i>in-vitro</i> diagnostiek
	Voldoet aan de Europese IVD-verordening 2017/746
	Identificatienummer van de aangemelde instantie
	Voldoende voor <n> tests
	Limieten voor opslagtemperatuur
	Gebruiken voor
	Voorzichtig
	Fabrikant
	Productiedatum
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing

XVII. VOORBEEDEN VAN TESTRESULTATEN




Afb. 3: Voorbeelden van resultaten verkregen met de α-Globin StripAssay®

- (A.) normaal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
- (B.) -3,7 heterozygoot (-3,7/ $\alpha\alpha$)
- (C.) -3,7 homozygoot (-3,7/-3,7)
- (D.) -4,2 + IVS1-5nt heterozygoot (-4,2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse heterozygoot (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring homozygoot (HbCS/HbCS)
- (G.) -3,7 + --MED-I heterozygoot (-3,7/--MED-I)
- (H.) negatieve controle of mislukte PCR

OPMERKINGEN

XVIII. AANVERWANTE PRODUCTEN

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 extracties
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 extracties
6-080	Typing Trays	5

Distributeur:

 **Fabrikant:**

 **ViennaLab[®]**

ViennaLab Diagnostics GmbH

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

t: +43 1 8120156-0

e: info@viennalab.com

w: www.viennalab.com