

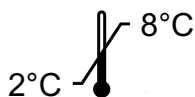
# $\alpha$ -Globin StripAssay<sup>®</sup>

Instrukcja używania

**REF**



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



**IVD**



Wersja: wer. 1.3 / polski  
Elektroniczna instrukcja używania i inne  
wersje językowe są dostępne na stronie  
[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)

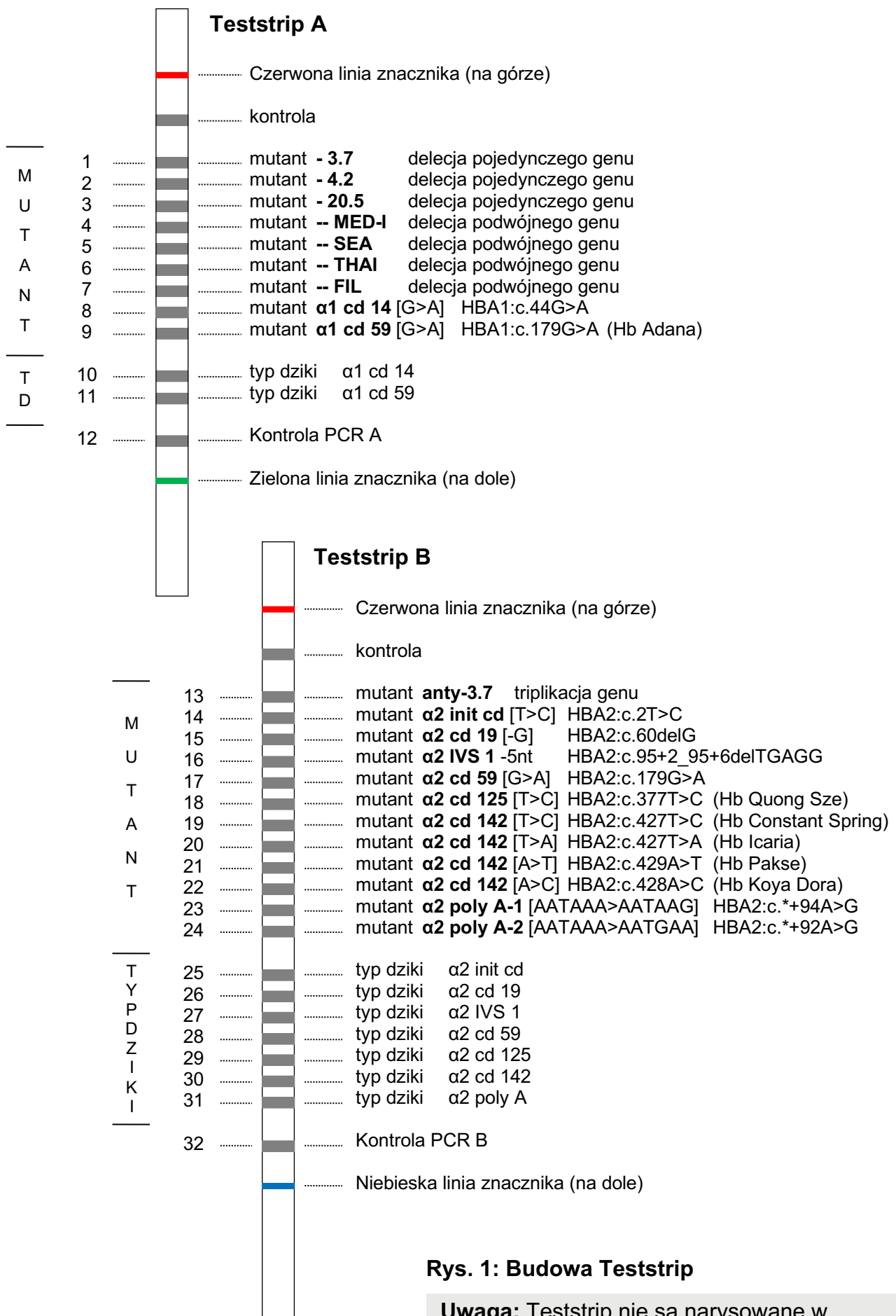
**SPIS TREŚCI**

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

**HISTORIA ZMIAN:**

wersja	data	opis
wersja 1.1	2022-02	Znak CE z numerem identyfikacyjnym jednostki notyfikowanej; łącznie do SSP; oświadczenie o źródle próbki i zastosowaniu ręcznym/półautomatycznym (I); specyfikacja elementów zestawu (IV); dane dotyczące skuteczności klinicznej (VIII)
wersja 1.2	2022-05	Data wydania, łącznie z odniesieniem do elektronicznej instrukcji obsługi (eIFU), Iran (II).
wersja 1.3	2022-11	Poprawki układu i rozdzielczości rysunków

Podsumowanie bezpieczeństwa i skuteczności (SSP, Summary of Safety and Performance) testu StripAssay® można znaleźć w europejskiej bazie danych o wyrobach medycznych (EUDAMED):  
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed> lub uzyskać od producenta.



**Rys. 1: Budowa Teststrip**

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

## **I. PRZEZNACZENIE**

α-Globin StripAssay® to jakościowy test genetyczny do celowanej analizy 21 częstych dużych delecji i mutacji punktowych genów podjednostki *alfa 1 hemoglobiny* (*HBA1, hemoglobin subunit alpha 1*) oraz *alfa 2* (*HBA2, hemoglobin subunit alpha 2*) w DNA wyizolowanym z ludzkiej krwi obwodowej. Test służy do genetycznego potwierdzenia podejrzenia alfa-talasemii. Ponadto test można wykorzystać do badania przesiewowego w kierunku statusu nosicielstwa talasemii u krewnych pacjenta i w populacji ogólnej. Test StripAssay® można przeprowadzić ręcznie lub półautomatycznie.

Do stosowania w diagnostyce *in vitro* u ludzi.

## **II. INFORMACJE PODSTAWOWE**

Mutacje w genie *alfa-globiny* są genetyczną przyczyną alfa-talasemii, choroby dziedzicznej w sposób autosomalny recesywny, która charakteryzuje się niewystarczającą produkcją łańcucha alfa-globiny lub jej brakiem, co prowadzi do zróżnicowanego obrazu klinicznego w zależności od liczby zmienionych alleli.

Badaniu należy poddać pacjentów z wartościami hematologicznymi charakterystycznymi niedokrwistości mikrocytarnej i odpowiadającymi im wzorcami hemoglobiny, członkowie rodziny chorego, potencjalni rodzice, a także osoby z populacji wysokiego ryzyka (np. region śródziemnomorski, Afryka, Półwysep Arabski, Iran, Indie i Azja Południowo-Wschodnia), u których istnieje ryzyko nosicielstwa alfa-talasemii.

## **III. METODOLOGIA**

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

Test α-Globin StripAssay® wykrywa następujące mutacje w locus genu *alfa globiny*:

Nazwa przestarzała	Nomenklatura HGVS	RefSNP
1 -3,7 kb	NG_000006.1:g.34164_37967del3804	--
2 -4,2 kb	nie dotyczy	--
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 Triplikacja genu anty-3.7	nie dotyczy	--
9 cd 14 [G>A]	HBA1:c.44G>A	rs63750090
10 cd 59 [G>A] Hb Adana	HBA1:c.179G>A	rs28928878
11 initiation cd [T>C]	HBA2:c.2T>C	rs111033603
12 cd 19 [-G]	HBA2:c.60delG	rs886041399
13 IVS1-5nt	HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG	rs41474145
14 cd 59 [G>A]	HBA2:c.179G>A	rs281864846
15 cd 125 [T>C] Hb Quong Sze	HBA2:c.377T>C	rs41397847
16 cd 142 [T>C] Hb Constant Spring	HBA2:c.427T>C	rs41464951
17 cd 142 [T>A] Hb Icaria	HBA2:c.427T>A	rs41464951
18 cd 142 [A>T] Hb Pakse	HBA2:c.429A>T	rs41412046
19 cd 142 [A>C] Hb Koya Dora	HBA2:c.428A>C	rs41321345
20 polyA-1 [AATAAA>AATAAG]	HBA2:c.*+94A>G	rs63751269
21 polyA-2 [AATAAA>AATGAA]	HBA2:c.*+92A>G	rs63750067

Sekwencja referencyjna (RefSeq, Reference Sequence):

NG\_000006.1



NM\_000558.3 (HBA1)

NM\_000517.4 (HBA2)

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

**IV. ELEMENTY ZESTAWU**

**REF**

	<b>4-160</b>	<b>4-160-A</b>	<b>4-160 -TRIAL</b>
1a. <b>Amplification Mix A1</b> ( <i>żółta nasadka</i> )	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
1b. <b>Amplification Mix A2</b> ( <i>biała nasadka</i> )	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
1c. <b>Amplification Mix B</b> ( <i>zielona nasadka</i> )	250 µl	2 x 250 µl	250 µl
2. <b>Taq Dilution Buffer Taq</b> ( <i>przezroczysta nasadka</i> )	500 µl	500 µl	500 µl
3. <b>HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)</b> ( <i>czerwona nasadka</i> )	125 U	175 U	125 U
4. <b>DNAT</b> ( <i>niebieska nasadka</i> )	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<p> Ostrzeżenie: DNAT zawiera 1,6% NaOH                      H315: Działa drażniąco na skórę                      H319: Działa drażniąco na oczy                      P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy                      P337 + P313: W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza</p>			
5. <b>Typing Trays</b>	3	---	2
6a. <b>Teststrip A</b> ( <i>czarna nasadka</i> )	10	24	5
6b. <b>Teststrip B</b> ( <i>biała nasadka</i> )	10	24	5
7. <b>Hybridization Buffer</b> ( <i>biała nasadka</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
8. <b>Wash Solution A</b> ( <i>biała nasadka</i> )	80 ml	200 ml	80 ml
9. <b>Conjugate Solution</b> ( <i>przezroczysta nasadka</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
10. <b>Wash Solution B</b> ( <i>przezroczysta nasadka</i> )	80 ml	200 ml	80 ml
11. <b>Color Developer</b> ( <i>brązowa nasadka</i> )	25 ml	65 ml	25 ml
<p> Ostrzeżenie: Color Developer zawiera ≤0,4% kwasu maleinowego                      H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry                      P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy                      P302 + P352: W przypadku kontaktu ze skórą: umyć dużą ilością wody                      P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza</p>			
12. <b>Instrukcja używania</b>	1	1	1
13. <b>Collector™ Sheet</b>	1	3	1

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

<b>Nazwa komponentu</b>	<b>Skład</b>
Amplification Mix A1/A2/B	Swoiste względem sekwencji oligonukleotydy znakowane 5'-biotyną, równomolowa mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dATP, dCTP, dGTP i dTTP), MgCl <sub>2</sub> , bufor siarczanu amonu, betaina, 0,05% azydek sodu
Taq Dilution Buffer	bufor do HS-Taq DNA Polymerase, w tym KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> i MgCl <sub>2</sub> , 0,05% azydek sodu
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	hot start Taq DNA Polymerase 5 U/µl
DNAT	Roztwór zasadowy zawierający 1,6% wodorotlenku sodu i niebieski barwnik wskazujący zmianę pH
Typing Trays	plastikowy pojemnik z ośmioma studzienkami

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

## V. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIE DOSTARCZANE

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

- Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab)
- Termocykler z podgrzewaną pokrywą (specyfikacja szybkości narastania, patrz punkt VIII)
- Łaźnia wodna z platformą wytrząsającą, pokrywą i regulowaną temperaturą ( $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ )
- Wytrząsarka (wytrząsarka kołyskowa lub orbitalna)

### Opcjonalnie:

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

## VI. PROCEDURA TESTU

### 1. Przygotowanie próbki

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

**Ekstrakcja DNA:** Doprowadzić próbki krwi do temperatury pokojowej. Dobrze wymieszać, kilkakrotnie ostrożnie odwracając probówki do pobierania krwi. Powtarzać mieszanie za każdym razem przed pobraniem porcji krwi. Do izolacji DNA z krwi pełnej zaleca się stosowanie zestawu **Spin Micro DNA Extraction Kit** (REF 2-020, ViennaLab). Stosowanie innych metod izolacji DNA w przypadku testu α-Globin StripAssay® nie zostało zatwierdzone. W przypadku stosowania innych systemów ekstrakcji DNA stężenie i czystość DNA powinny mieścić się w zakresie od 2 do 10 ng/μl, a stosunek  $OD_{A260/280}$  wynosić, odpowiednio, od 1,7 do 2,0. Wyższe stężenia DNA należy rozcieńczyć do zalecanego zakresu przed wprowadzeniem do PCR.

**Uwaga:** DNA zawierający inhibitory PCR i/lub cząstki magnetyczne pochodzące z systemu ekstrakcji opartej na kulkach może być oporny na amplifikację i należy go rozcieńczyć do 2 ng/μl za pomocą wody do PCR.

Wyekstrahowany DNA należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C (do jednego tygodnia) lub w temperaturze od -30°C do -15°C (przez dłuższy okres) do momentu przeprowadzenia analizy.

## 2. Amplifikacja in vitro (PCR) – 3 osobne reakcje dla każdej próbki

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

- Za każdym razem przygotować świeżą, odpowiednią ilość roztworu roboczego (1:15, końcowe stężenie 0,33 U/μl) **HS-Taq DNA Polymerase** (5 U/μl, czerwona nasadka) w **Taq Dilution Buffer** (przezroczysta nasadka) dla liczby próbek do analizy oraz **kontroli bez matrycy** (NTC, no-template control).

Składnik	na reakcję	np. 10 reakcji
HS-Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,33 μl	3,3 μl
Taq Dilution Buffer	4,67 μl	46,7 μl
Roztwór roboczy	5 μl	50 μl

- Przygotować trzy probówki reakcyjne dla każdej próbki, która ma zostać poddana amplifikacji. Umieścić probówki na lodzie.
- Dla każdej próbki przygotować 3 końcowe mieszaniny reakcyjne PCR (A1, A2, B) na lodzie:
  - A1: **15 μl Amplification Mix A1** (żółta nasadka)  
**5 μl rozcieńczonej HS-Taq DNA Polymerase** (1,66 U)  
**5 μl matrycy DNA**
  - A2: **15 μl Amplification Mix A2** (biała nasadka)  
**5 μl rozcieńczonej HS-Taq DNA Polymerase** (1,66 U)  
**5 μl matrycy DNA**
  - B: **15 μl Amplification Mix B** (zielona nasadka)  
**5 μl rozcieńczonej HS-Taq DNA Polymerase** (1,66 U)  
**5 μl matrycy DNA**

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

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

- Szczelnie zakręcić probówki. Rozgrzać termocykler do 95°C.
- Włożyć probówki reakcyjne i uruchomić następujący program termocyklera:
  - Przed PCR: 95°C/5 min**
  - Termocykling: 97°C/40 s – 64°C/40 s – 72°C/01:30 min (3 cykli)**  
**97°C/40 s – 58°C/40 s – 72°C/01:30 min (37 cykli)**
  - Elongacja końcowa: 72°C/5 min**
- Produkty amplifikacji przechowywać na lodzie lub w temperaturze od 2°C do 8°C do dalszego wykorzystania.

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

Długości fragmentów: 881 pz; delecje: 1783 pz (A1)  
 296 pz; delecje: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 pz (A2)  
 302, 864 pz; delecje: 1772 pz (B)

### 3. Przetwarzanie Teststrip

#### 3.1. Hybrydyzacja (ręczna) – 2 Teststrip na próbkę (45°C, łaźnia wodna z wytrząsaniem)

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

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

W przypadku wszystkich **Teststrip A**  
(jedna ścieżka na próbkę):

- Odpipetować **20 µl DNAT** (niebieska nasadka) do dolnego rogu każdej ścieżki, która ma zostać użyta w Typing Trays.
- Dodać **10 µl produktu amplifikacji A1** do odpowiedniej kropli DNAT.
- Do tej samej kropli dodać **10 µl produktu amplifikacji A2**.
- Dokładnie wymieszać za pomocą pipety. (Roztwór pozostanie niebieski.)

- Odstawić na **5 min** w temperaturze pokojowej.
- Do każdej ścieżki dodać **1 ml Hybridization Buffer** (podgrzanego do 45°C). Delikatnie potrząsnąć pojemnikiem. (Niebieski kolor zniknie.)
- Włożyć **Teststrip A** lub **Teststrip B** oznaczoną stroną do góry (linie widoczne!) w odpowiednie ścieżki. Należy je w całości zanurzyć.
- Inkubować przez **30 min** w temperaturze **45°C** na platformie wytrząsającej łaźni wodnej.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Instrument do automatycznego przetwarzania Teststrip musi spełniać następujące wymagania:

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

## VII. INTERPRETACJA WYNIKÓW

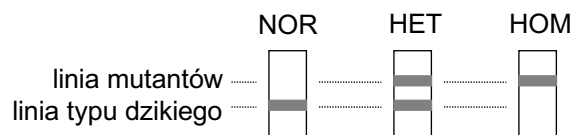
Genotyp próbki jest określany z odpowiednim Teststrip A i B za pomocą dołączonej Collector™ Sheet. Oba przetworzone Teststrip należy umieścić w wyznaczonych polach, dopasować je do schematu za pomocą czerwonej linii znacznika (na górze) i zielonej lub niebieskiej linii znacznika (na dole) i unieruchomić taśmą klejącą.

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

Dodatnia reakcja linii kontroli PCR A i kontroli PCR B wskazuje na obecność właściwych produktów amplifikacji. Linie te muszą zawsze barwić się dodatnio, z wyjątkiem kontroli bez matrycy, która zamiast matrycy DNA zawiera wodę (patrz przykład H, strona 18).

Brak kontroli PCR na Teststrip może wskazywać na fałszywą hybryzację produktów amplifikacji Mix A1/A2 z Teststrip B i produktów amplifikacji Mix B z Teststrip A. Test należy powtórzyć.

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



**Rys. 2: Genotypy – wzory wybarwienia na Teststrip**

	linia typu dzikiego	linia mutantów	genotyp
NOR	<b>dodatni</b>	ujemny	normalny
HET	<b>dodatni</b>	<b>dodatni</b>	heterozygotyczny
HOM	ujemny	<b>dodatni</b>	homozygotyczny mutant

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

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

Niektóre mutacje punktowe ujęte w teście α-Globin StripAssay® są zlokalizowane w niewielkiej liczbie nukleotydów genu *α-globiny*. Na Teststrip są one reprezentowane przez zwykłą sondę typu dzikiego, tak więc 21 mutacji jest objętych tylko 9 sondami typu dzikiego:

linia	sonda typu dzikiego	mutacja
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 Quang 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

Próbki złożone heterozygotyczne pod względem dwóch z tych mutacji (np. Hb Constant Spring + Hb Pakse) nie będą dawać częstego sygnału typu dzikiego (patrz przykład E, strona 18).

Próbki złożone heterozygotyczne pod względem jednej z mutacji α1/α2, które mają pojedynczą lub podwójną delecję genu, w większości przypadków nie będą dawać odpowiedniego sygnału typu dzikiego (patrz przykład D, strona 18).

W przypadku delecji pojedynczego i podwójnego genu kilka sond typu dzikiego rozróżnia status mutantu heterozygotycznego i homozygotycznego (patrz przykłady B i C, strona 18):

delecja	heterozygotyczny	homozygotyczny mutant
-3,7	obecne wszystkie sygnały WT	brak sygnałów WT 25-31
-4,2	obecne wszystkie sygnały WT	brak sygnałów WT 25-31
-20,5 kb	obecne wszystkie sygnały WT	brak sygnałów WT 10 i 25-31
-- MED-I	obecne wszystkie sygnały WT	brak wszystkich sygnałów WT
-- SEA	obecne wszystkie sygnały WT	brak wszystkich sygnałów WT
-- THAI	obecne wszystkie sygnały WT	brak wszystkich sygnałów WT
-- FIL	obecne wszystkie sygnały WT	brak wszystkich sygnałów WT

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

## VIII. OCENA SKUTECZNOŚCI

**Dokładność** testu α-Globin StripAssay® została określona poprzez analizę 330 wstępnie typowanych próbek genomowego DNA. Oprócz jednej próbki wyniki były zgodne z metodą referencyjną (sekwencjonowanie Sanger, gap-PCR, ARMS-PCR, odwrotna analiza dot-blot, próbki pochodzące z EQA). Heterozygotyczna próbka poliA-2, która wyłoniła się z rzadkiej rekombinacji końców 3' genów *alfa-2* i *pseudo-alfa*, była typowana wpisany jako fałszywie ujemna (typ dziki) w teście StripAssay®. Test prawidłowo wykrył 359 zmutowanych alleli (= 99,7% zgodności procentowej wyników dodatnich) i 300 alleli typu dzikiego (= 100% zgodności procentowej wyników ujemnych).

**Precyzja** testu α-Globin StripAssay® była oceniana jako zmienność pomiędzy powtórzeniami, operatorami, dniami, termocyklerami i urządzeniami do hybrydyzacji. Wśród łącznie 62 testów przeprowadzonych w ramach badanych parametrów, 61 wykazało oczekiwane wyniki genotypowania, a w przypadku jednej próbki test zakończył się niepowodzeniem ze względu na niedokładność pipetowania wzorca DNA. Widoczne były jedynie nieistotne różnice w intensywności wybarwienia Teststrip i nie zaobserwowano żadnego przypadku wybarwienia tła. Test α-Globin StripAssay® został zwalidowany na urządzeniach AB GeneAmp® PCR System 2700, MJ Research PTC-200 i Eppendorf Mastercycler X50s, które charakteryzują się szybkością ogrzewania i chłodzenia w zakresie, odpowiednio, od 1,7 do 6,3°C/s i od 1,4 do 3,7°C/s.

Użycie innych termocyklorów musi zostać zweryfikowane przez użytkownika.

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

**Skuteczność kliniczna:** W wielośrodkowym badaniu porównawczym (Puehringer i wsp. 2007) za pomocą testu α-Globin StripAssay® zbadano łącznie 272 próbki pobrane od pacjentów z ujęcia wody w obszarze ośmiu różnych ośrodków talasemii na całym świecie oraz metod referencyjnych stosowanych rutynowo w tych laboratoriach. Spośród 544 alleli α-globiny typu dzikiego lub alleli zmutowanych w kohorcie pacjentów wyniki dla 523 (96,14%) były całkowicie zgodne pomiędzy testem StripAssay® i metodami wewnętrznymi.

## IX. SUBSTANCJE ZAKŁÓCAJĄCE

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

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

## **X. OGRANICZENIA TESTU**

Test α-Globin StripAssay® jest przeznaczony wyłącznie do diagnostyki 21 znanych mutacji wymienionych w punkcie III, które są reprezentowane przez swoiste względem alleli sondy wychwytyjące znajdujące się na Teststrip. Nie jest możliwe wykrycie innych delecji alfa-globiny, mutacji punktowych ani rekombinacji, które mogą występować w próbce pacjenta. W najlepszym przypadku pominięta mutacja punktowa zlokalizowana w sekwencji obejmującej sondę wychwytyjącą może zostać wskazana przez utratę sygnału typu dzikiego na Teststrip, gdy występuje jednocześnie z delecją pojedynczego lub podwójnego genu lub jest w stanie homozygotycznym.

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

Test paskowy α-Globin StripAssay® nie umożliwia rozróżnienie pomiędzy heterozygotycznym i homozygotycznym stanem mutanta w postaci triplikacji genu anty-3.7 (anty-3.7/αα i anty-3.7/anty-3.7).

W obecności dużych delecji genowych niewykrywalnych za pomocą tego testu delecje pojedynczego genu (-3.7 lub -4.2) i mutacje punktowe wydają się homozygotyczne.

Testu α-Globin StripAssay® nie wolno używać do celów diagnostyki prenatalnej ani preimplantacyjnej diagnostyki genetycznej. Test nie został zwalidowany z wykorzystaniem próbek pochodzących z próbek kosmówki, płynu owodniowego czy krwi pępowinowej.

Test α-Globin StripAssay® jest przeznaczony wyłącznie do profesjonalnego użytku laboratoryjnego.

## **XI. KWESTIE DOTYCZĄCE JAKOŚCI**

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

## **XII. BEZPIECZEŃSTWO**

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

### **XIII. POMOC TECHNICZNA**

Pomoc techniczną można uzyskać:

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













### **XIV. BIBLIOGRAFIA**

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

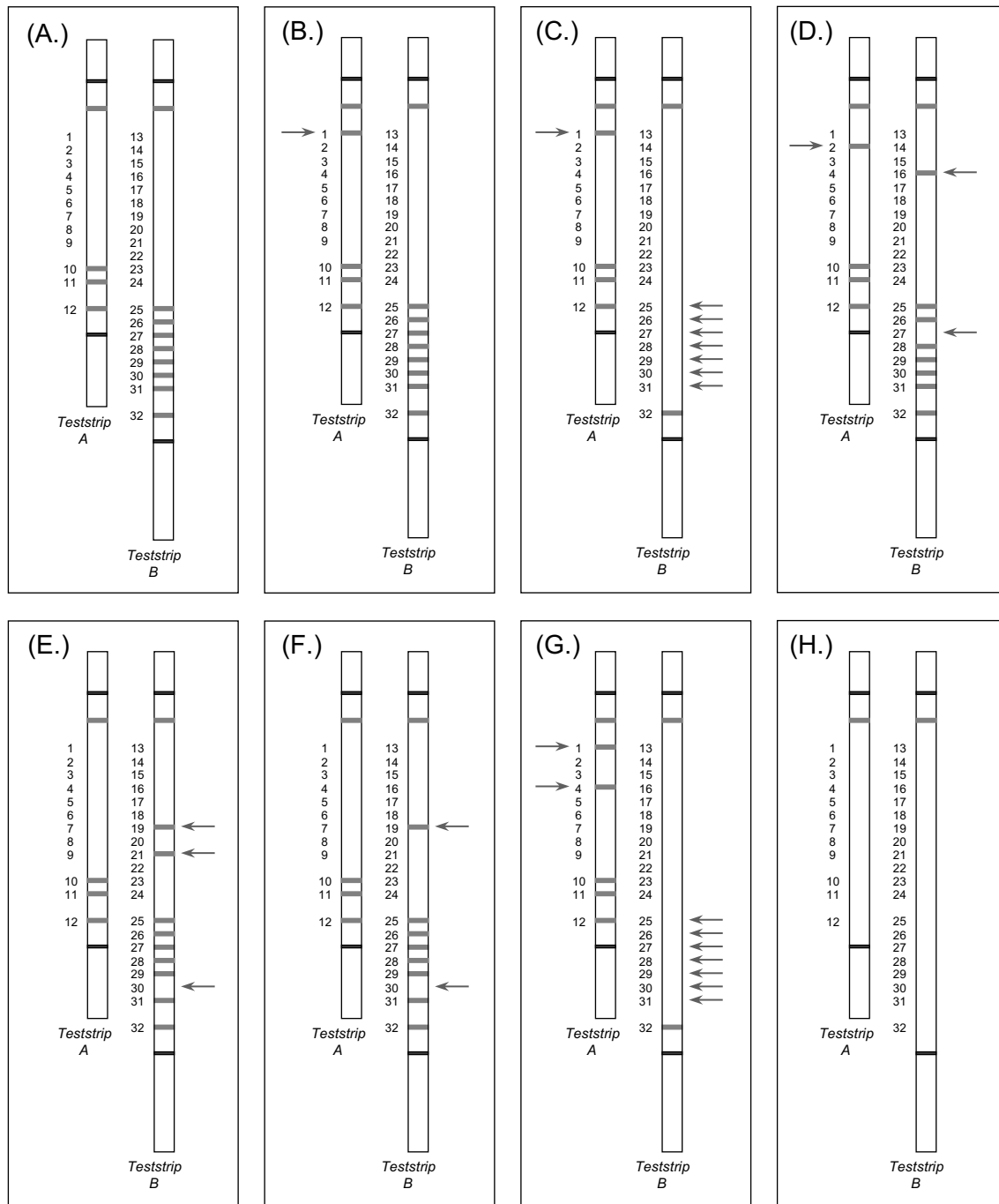
### **XV. INFORMACJE DLA PRODUCENTA**

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

**XVI. SYMBOLE**

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

XVII. PRZYKŁADY WYNIKÓW TESTU




Rys. 3: Przykłady wyników uzyskanych za pomocą testu  $\alpha$ -Globin StripAssay®

- (A.) normalny ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ )
- (B.) -3.7 heterozygotyczny (-3.7/ $\alpha\alpha$ )
- (C.) -3.7 homozygotyczny (-3,7/-3.7)
- (D.) -4.2 + IVS1-5nt heterozygotyczny (-4.2/IVS1-5nt)
- (E.) Hb Constant Spring + Hb Pakse heterozygotyczny (HbCS/HbPak)
- (F.) Hb Constant Spring homozygotyczny (HbCS/HbCS)
- (G.) -3.7 + --MED-I heterozygotyczny (-3.7/--MED-I)
- (H.) kontrola ujemna lub niepowodzenie PCR

**UWAGI**

## XVIII. PRODUKTY POWIĄZANE

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

**Dystrybutor:**



**Producent:**



**ViennaLab Diagnostics GmbH**

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

t: +43 1 8120156-0

e: [info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

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