

CF StripAssay[®] EXT

REF

4-440

IVD



10 Tests



2-8°C

CE

1.	Lysis Solution	50 ml	
2.	GEN^XTRACT Resin	5 ml	
	<i>Resuspend each time <u>immediately</u> before removing an aliquot.</i>		
3a.	Amplification Mix A (yellow cap)	250 µl	
3b.	Amplification Mix B (green cap)	250 µl	
4.	Taq Dilution Buffer (transparent cap)	500 µl	
5.	HS Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (red cap)	125 U	
6.	DNAT (blue cap)	1.5 ml	Warning
7.	Typing Trays	3	
8a.	Teststrips A (black cap)	10	
8b.	Teststrips B (white cap)	10	
9.	Hybridization Buffer (white cap)	25 ml	
10.	Wash Solution A (white cap)	80 ml	
11.	Conjugate Solution	25 ml	
12.	Wash Solution B	80 ml	
13.	Color Developer	25 ml	

ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

Fax: (+43-1) 8120156-19

info@viennalab.com



ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

www.viennalab.com

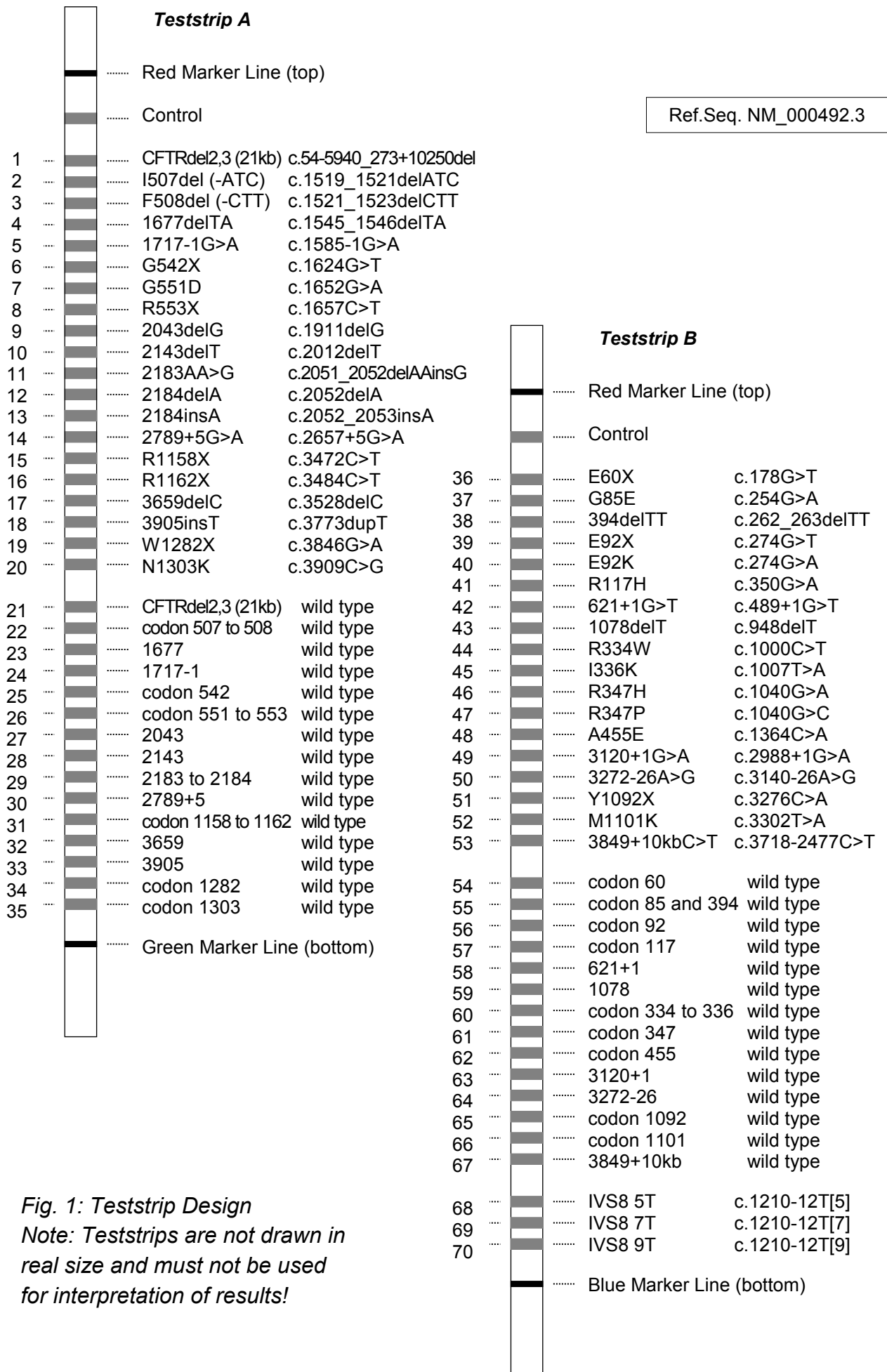


Fig. 1: Teststrip Design

Note: Teststrips are not drawn in real size and must not be used for interpretation of results!

Instructions for use

I. INTENDED USE

Assay for the identification of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene mutations based on polymerase chain reaction (PCR) and reverse-hybridization. *For human in vitro diagnostics.*

II. METHODOLOGY

The procedure includes three steps: (1) DNA isolation, (2) PCR amplification using biotinylated primers, (3) hybridization of amplification products to test strips containing allele-specific oligonucleotide probes immobilized as an array of parallel lines (Fig. 1). Bound biotinylated sequences are detected using streptavidin-alkaline phosphatase and color substrates.

The assay covers 38 mutations and 1 polymorphism in the CFTR gene: CFTRdel2,3 (21kb), I507del (-ATC), F508del (-CTT), 1677delTA, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, 2043delG, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 2184insA, 2789+5G>A, R1158X, R1162X, 3659delC, 3905insT, W1282X, N1303K [Teststrip A]; E60X, G85E, 394delTT, E92X, E92K, R117H, 621+1G>T, 1078delT, R334W, I336K, R347H, R347P, A455E, 3120+1G>A, 3272-26A>G, Y1092X, M1101K, 3849+10kbC>T, IVS8 5T/7T/9T [Teststrip B].

Further genetic information is available at OMIM Online Mendelian Inheritance in Man: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

III. KIT COMPONENTS

See list of all kit components on page I.

DNAT contains 1.6% NaOH.

Warning

H315: Causes skin irritation

H319: Causes serious eye irritation

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection

P337 + P313: If eye irritation persists: Get medical advice/attention

Amplification Mix, Taq Dilution Buffer, Conjugate Solution, Wash Solution B contain 0.05% NaN₃. Conjugate Solution contains streptavidin-alkaline phosphatase. Color Developer contains nitro blue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP).

Store all reagents at 2-8°C when not in use !

IV. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

In addition to standard molecular biology laboratory equipment, the following is needed:

- Thermocycler and suitable thin-walled plastic reaction tubes/strips
- Waterbath with shaking platform and adjustable temperature (45°C ± 0.5°C)
- Vacuum aspiration apparatus
- Shaker (rocker or orbital shaker)
- *Optional: agarose gel electrophoresis equipment (for control of amplification products)*

V. ASSAY PROCEDURE

1. DNA Isolation

Use fresh or frozen blood with EDTA or citrate anticoagulant; avoid blood containing heparin. Do not store blood for more than 3 days at ambient temperature or more than 1 week at 2-8°C before use. Blood which has been kept frozen for more than one year, or gone through more than three freeze-thaw cycles is unsuitable to be used in this procedure.

Bring blood samples to room temperature. Mix well by carefully inverting blood collection tubes several times. Repeat mixing each time before withdrawing an aliquot of blood.

Allow Lysis Solution and GEN^XTRACT Resin to reach room temperature.

- Pipette **100 µl blood sample** into a 1.5 ml microtube with screw cap.
- Add **1 ml Lysis Solution**, close tube and mix by inverting several times.
- Let stand for **15 min.** at room temperature.
- Centrifuge for **5 min.** at **3,000 rpm** (approx. 1,000 x g) in a microcentrifuge.
- Remove and discard the upper (top) 1 ml of supernatant.
- Add **1 ml Lysis Solution**, close tube and mix by inverting several times.
- Centrifuge for **5 min.** at **12,000 rpm** (approx. 12,000 x g) in a microcentrifuge.
- Remove and discard the supernatant except for approx. 50 µl of a visible, soft pellet.
- Resuspend GEN^XTRACT Resin by swirling the bottle thoroughly.
- Add **200 µl GEN^XTRACT Resin** to the pellet. Close tube and vortex for 10 sec.
 ⚠ GEN^XTRACT Resin sediments quickly. Repeat resuspension each time immediately before removing another aliquot.
- Incubate for **20 min.** at **56°C**. Vortex for 10 sec.
- Incubate for **10 min.** at **98°C**. Vortex for 10 sec.
- Centrifuge for **5 min.** at **12,000 rpm** in a microcentrifuge. Cool on ice.

The resulting supernatant contains DNA template suitable for immediate use in PCR. For further storage, the supernatant should be transferred into a fresh tube and kept refrigerated (2-8°C; up to one week) or frozen at -20°C.

2. In Vitro Amplification (PCR; 2 separate reactions per sample)

Keep all PCR reagents and DNA templates refrigerated throughout. Perform all steps until start of the thermal cycling program on ice (0-4°C).

- Prepare a fresh working dilution (1:25, final conc. 0.2 U/µl) of **HS Taq DNA Polymerase** (red cap) in **Taq Dilution Buffer** (transparent cap).
- Prepare two reaction tubes for each sample to be amplified. Place tubes on ice.
- For each sample prepare 2 final PCR reaction mixes (A and B) on ice:

15 µl Amplification Mix A (yellow cap)	and	15 µl Amplification Mix B (green cap)
5 µl diluted HS Taq DNA Polymerase (1U)		5 µl diluted HS Taq DNA Polymerase (1U)
5 µl DNA template		5 µl DNA template

If DNA templates not prepared by the kit isolation protocol (chapter V/1) are used, a DNA concentration range of 2-20 µg/ml (= 10-100 ng DNA per reaction) is recommended.

- *Cap tubes tightly. Preheat the thermocycler to 94°C.*
- Insert reaction tubes and run the following thermocycling program:
 - pre-PCR: 94°C/3 min.
 - thermocycling: 94°C/15 sec. - 60°C/45 sec. - 72°C/1 min. (35 cycles)
 - final extension: 72°C/3 min.

Store amplification products on ice or at 2-8°C for further use.

Optional: Analyze amplification products by gel electrophoresis (e.g. 3% agarose gel).

Fragment lengths: 472, 345, 315, 278, 257, 236/213, 194, 165 bp (amplification product A)

386, 350, 322, 297, 248, 225, 200, 172, 155 bp (amplification product B)

3. Hybridization - 2 Teststrips per sample (45°C; shaking waterbath)

Adjust the water level of the waterbath to approx. ½ of the height of the Typing Tray.

Heat the waterbath to exactly 45°C (± 0.5°C). Check water temperature with a calibrated thermometer.

Prewarm Hybridization Buffer and Wash Solution A to 45°C. (Take care that all precipitates formed at 2-8°C become completely dissolved.)

Allow Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B and Color Developer to reach room temperature. Prepare Typing Tray(s).

Remove one Teststrip A and one Teststrip B for each sample using clean tweezers. (Touch Teststrips with gloves only!) Label Teststrips outside of the marker lines with a pencil. (No ballpoint pens, markers, etc.)

*For all **Teststrips A** (one lane per sample):*

- Pipette **10 µl DNAT** (blue cap) into the lower corner of each lane to be used in the Typing Trays.
- Add **10 µl amplification product A** into the corresponding drop of DNAT.

*Mix thoroughly with a pipette.
(The solution will remain blue.)*

*For all **Teststrips B** (one lane per sample):*

- Pipette **10 µl DNAT** (blue cap) into the lower corner of each lane to be used in the Typing Trays.
- Add **10 µl amplification product B** into the corresponding drop of DNAT.

Mix thoroughly with a pipette. (The solution will remain blue.)

- Let stand for **5 min.** at room temperature.
- Add **1 ml Hybridization Buffer** (prewarmed to 45°C) into each lane. Gently agitate tray. *(The blue color will disappear.)*
- Insert **Teststrip A** or **Teststrip B** with marked side up (lines visible!) into the respective lanes. Submerge completely.
- Incubate for **30 min.** at **45°C** on the shaking platform of the waterbath. *Set moderate shaking frequency (approx. 50 rpm) to avoid spilling. Keep the cover of the waterbath closed to avoid variations in temperature.*
- At the end of incubation remove hybridization solutions by vacuum aspiration. *Proceed immediately. Do not allow Teststrips to run dry during the entire procedure.*

4. Stringent Wash (45°C; shaking waterbath)

- Add **1 ml Wash Solution A** (prewarmed to 45°C). Rinse briefly (10 sec.). Remove liquids by vacuum aspiration.
- Add **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Incubate for **15 min.** at **45°C** in the shaking waterbath. Remove liquids by vacuum aspiration.
- Add **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Incubate for **15 min.** at **45°C** in the shaking waterbath. Remove liquids by vacuum aspiration.

5. Color development (room temperature)

- Add **1 ml Conjugate Solution**.
- Incubate for **15 min.** at **room temperature** on a rocker or orbital shaker. Remove liquids by vacuum aspiration.
- Add **1 ml Wash Solution B**. Rinse briefly (10 sec.). Remove liquids by vacuum aspiration.
- Add **1 ml Wash Solution B**.
- Incubate for **5 min.** at **room temperature** on a rocker or orbital shaker. Remove liquids by vacuum aspiration.
- Add **1 ml Wash Solution B**.
- Incubate for **5 min.** at **room temperature** on a rocker or orbital shaker. Remove liquids by vacuum aspiration.
- Add **1 ml Color Developer**.
- Incubate for **15 min.** at **room temperature in the dark** on a rocker or orbital shaker. *A purple staining will appear upon positive reaction.*
- Wash Teststrips several times with distilled water. Let strips dry in the dark on absorbent paper. *Do not expose Teststrips to intense light after Color Development.*

VI. INTERPRETATION OF RESULTS

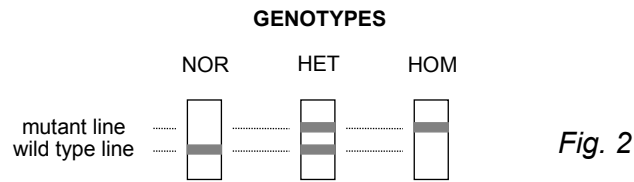
The genotype of a sample is determined from corresponding Teststrips A and B using the enclosed Collector™ sheet.

Place both processed Teststrips into the designated fields, align them to the schematic drawing using the red marker line (top) and the green or blue marker line (bottom), and fix them with adhesive tape.

A positive reaction of the uppermost Control line indicates the correct function of Conjugate Solution and Color Developer. This line should always stain positive.

For each polymorphic position, one of the following staining patterns should be obtained:

Note: Staining intensities of positive lines may vary. This is of no significance for the result.



	wild type line	mutant line	genotype
NOR	positive	negative	normal
HET	positive	positive	heterozygous
HOM	negative	positive	homozygous mutant

See examples of StripAssay results on page III (Fig. 3).

Some of the point mutations covered by the CF StripAssay® EXT are located within a few nucleotides on the CFTR gene. On the Teststrips these are represented by a common wild type probe, so that the 38 mutations are covered by 29 wild type probes only.

line	wild type probe	mutation
22	codon 507 to 508	I507del (-ATC), F508del (-CTT)
26	codon 551 to 553	G551D, R553X
29	2183 to 2184	2183AA>G, 2184delA, 2184insA
31	codon 1158 to 1162	R1158X, R1162X
55	codon 85 and 394	G85E, 394delTT
56	codon 92	E92X, E92K
60	codon 334 to 336	R334W, I336K
61	codon 347	R347H, R347P

Samples that are compound heterozygous for two of these mutations (e.g. I507del + F508del or G551D + R553X) will be lacking the common wild type signal (see example G, page III).

In addition to their wild type signal, homozygous CFTRdel2,3 samples will be lacking the wild type signals for codon 60 and for codon 85 and 394 (see example F, page III).

The benign variants I506V, I507V and F508C do not cause any assay interference and will appear as CFTR wildtype in the CF StripAssay®.

Advice on troubleshooting may be obtained by contacting ViennaLab through the local distributor or directly at the address provided on page I.

VII. QUALITY CONSIDERATIONS

- A thorough understanding of the procedure outlined here, and precise laboratory equipment and techniques are required to obtain reliable results. Use of the StripAssay for human *in vitro* diagnostics needs to be limited to appropriately trained personnel.
- Do not use StripAssay components beyond the expiration date printed on the outside of the kit box. Do not mix reagents from different lots.
- Avoid microbial contamination and cross-contamination of reagents or samples by using sterile disposable pipette tips throughout. Do not interchange bottle caps.
- The Control line immobilized on each Teststrip allows a performance control of the chromogenic detection system. To monitor and validate the specificity of the hybridization and washing steps, control DNAs of known genotype should be included into each individual experiment.

VIII. SAFETY

- Do not drink, eat, smoke, or apply cosmetics in designated work areas. Wear laboratory coats and disposable gloves when handling specimens and kit reagents. Wash hands thoroughly afterwards.
- Handle specimens as if capable of transmitting infectious agents. Thoroughly clean and disinfect all materials and surfaces that have been in contact with specimens. Discard all waste associated with clinical specimens in a biohazard waste container.
- Avoid contact of DNAT with skin, eyes, or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with large amounts of water. If spilled, dilute with water before wiping dry.
- Adhere to all local and federal safety and environmental regulations which may apply.

Gebrauchsanweisung

I. VERWENDUNGSZWECK

Test zum Nachweis von Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gen-Mutationen basierend auf Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und reverser Hybridisierung.
Für humane in-vitro-Diagnostik.

II. METHODIK

Das Verfahren besteht aus drei Schritten: (1) DNA Isolierung, (2) PCR Amplifizierung mittels biotin-markierter Primer, (3) Hybridisierung der Amplifizierungsprodukte an allel-spezifische Oligonukleotid-Sonden, welche als parallele Linien auf Teststreifen fixiert vorliegen (Fig. 1). Gebundene, biotin-markierte Sequenzen werden mittels Streptavidin-Alkalischer Phosphatase und Farbsubstraten nachgewiesen.

Der Test erfasst 38 Mutationen und 1 Polymorphismus im CFTR Gen: CFTRdel2,3 (21kb), I507del (-ATC), F508del (-CTT), 1677delTA, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, 2043delG, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 2184insA, 2789+5G>A, R1158X, R1162X, 3659delC, 3905insT, W1282X, N1303K [Teststrip A]; E60X, G85E, 394delTT, E92X, E92K, R117H, 621+1G>T, 1078delT, R334W, I336K, R347H, R347P, A455E, 3120+1G>A, 3272-26A>G, Y1092X, M1101K, 3849+10kbC>T, IVS8 5T/7T/9T [Teststrip B].

Darüberhinausgehende genetische Information unter OMIM Online Mendelian Inheritance in Man: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

III. KIT BESTANDTEILE

Siehe Liste aller Bestandteile des Kits auf Seite I.
DNAT enthält 1,6% NaOH.

Achtung

H315: Verursacht Hautreizungen

H319: Verursacht schwere Augenreizung

P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen

P337 + P313: Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen

Amplification Mix, Taq Dilution Buffer, Conjugate Solution, Wash Solution B enthalten 0,05% NaN₃. Conjugate Solution enthält Streptavidin-Alkalische Phosphatase. Color Developer enthält Nitro Blue Tetrazolium (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP).

Alle Bestandteile sind bei 2-8°C aufzubewahren wenn sie nicht in Gebrauch sind !

IV. ERFORDERLICHE ABER NICHT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

Über die in einem Molekularbiologielabor gebräuchliche Basisausrüstung hinaus benötigt man:

- Thermocycler und passende dünnwandige Plastik-Reaktionsgefäße bzw. -strips
- Schüttelwasserbad mit einstellbarer Temperatur (45°C ± 0,5°C)
- Vakuum-Absaugapparatur
- Schüttler (Wippe oder Kreisschüttler)
- *Optional: Ausrüstung für Agarose-Gelelektrophorese (Kontrolle der Amplifikate)*

V. ARBEITSANLEITUNG

1. DNA Isolierung

Verwenden Sie frisches oder gefrorenes Blut mit EDTA oder Zitrat als Antikoagulans; vermeiden Sie Blut das Heparin enthält.

Lagern Sie Blut vor der Verarbeitung nicht länger als 3 Tage bei Raumtemperatur oder nicht länger als 1 Woche bei 2-8°C. Blut das länger als ein Jahr tiefgefroren aufbewahrt, oder mehr als dreimal aufgetaut und wieder eingefroren wurde ist für die folgende Methode ungeeignet.

Bringen Sie die Blutproben auf Raumtemperatur. Durchmischen Sie die Proben sorgfältig indem Sie die Blutabnahme-Röhrchen mehrmals kippen. Wiederholen Sie das Mischen jedesmal vor Entnahme eines Aliquots an Blut.

Bringen Sie Lysis Solution und GEN^XTRACT Resin auf Raumtemperatur.

- **100 µl Blutprobe** in ein 1,5 ml verschraubbares Reaktionsgefäß pipettieren.
- **1 ml Lysis Solution** zugeben, Deckel aufschrauben und zum Mischen mehrmals kippen.
- **15 min.** bei Raumtemperatur stehen lassen.
- **5 min.** bei **3.000 U/min** (ca. 1.000 x g) in einer Tischzentrifuge abzentrifugieren.
- Den obersten 1 ml Überstand abheben und verwerfen.
- **1 ml Lysis Solution** zugeben, Deckel aufschrauben und zum Mischen mehrmals kippen.
- **5 min.** bei **12.000 U/min** (ca. 12.000 x g) in einer Tischzentrifuge abzentrifugieren.
- Den Überstand bis auf ca. 50 µl sichtbares, lockeres Pellet abheben und verwerfen.
- GEN^XTRACT Resin gründlich aufwirbeln.
- **200 µl GEN^XTRACT Resin** zum Pellet zugeben, Deckel aufschrauben und 10 sec. vortexen.
- **⚠ GEN^XTRACT Resin sedimentiert rasch. Das Aufwirbeln muss jedesmal unmittelbar vor Entnahme eines Aliquots wiederholt werden.**
- **20 min.** bei **56°C** inkubieren. 10 sec. vortexen.
- **10 min.** bei **98°C** inkubieren. 10 sec. vortexen.
- **5 min.** bei **12.000 U/min** in einer Tischzentrifuge abzentrifugieren. Auf Eis abkühlen.

Der gewonnene Überstand enthält DNA Vorlage die unmittelbar für PCR geeignet ist. Für darüberhinausgehende Lagerung sollte der Überstand in ein frisches Gefäß übergeführt werden und darin gekühlt (2-8°C; max. eine Woche) oder bei -20°C gefroren aufbewahrt werden.

2. In Vitro Amplifizierung (PCR; 2 separate Reaktionen pro Probe)

Verwahren Sie sämtliche PCR Reagenzien und DNA Vorlagen permanent gekühlt. Führen Sie alle Schritte bis zum Start des Thermocycling-Programms auf Eis (0-4°C) aus.

- Eine frische gebrauchsfertige Verdünnung (1:25, Endkonz. 0,2 U/µl) von **HS Taq DNA Polymerase** (roter Deckel) in **Taq Dilution Buffer** (transparenter Deckel) herstellen.
- Für jede zu amplifizierende Probe zwei Reaktionsgefäße auf Eis bereitstellen.
- Pro Probe 2 PCR Reaktionsmixe (A and B) auf Eis ansetzen:

15 µl Amplification Mix A (gelber Deckel)	und	15 µl Amplification Mix B (grüner Deckel)
5 µl verd. HS Taq DNA Polymerase (1U)		5 µl verd. HS Taq DNA Polymerase (1U)
5 µl DNA Vorlage		5 µl DNA Vorlage

Falls DNA Vorlagen verwendet werden, die nicht nach dem Kit Isolierungsprotokoll (Kap. V/1) gewonnen wurden, wird empfohlen die DNA in einem Konzentrationsbereich von 2-20 µg/ml (= 10-100 ng DNA pro Reaktion) einzusetzen.

- Reaktionsgefäße dicht verschliessen. Den Thermocycler auf 94°C vorheizen.
- Reaktionsgefäße einsetzen und das folgende Thermocycling-Programm starten:
 prä-PCR: 94°C/3 min.
 Thermocycling: 94°C/15 sec. - 60°C/45 sec. - 72°C/1 min. (35 Zyklen)
 Finale Extension: 72°C/3 min.

Amplifizierungsprodukte auf Eis oder bei 2-8°C für weitere Verwendung aufbewahren.

Optional: *Amplifizierungsprodukte mittels Gelelektrophorese (z.B. 3% Agarose-Gel) analysieren.*

*Fragmentlängen: 472, 345, 315, 278, 257, 236/213, 194, 165 bp (Amplifizierungsprodukt A)
 386, 350, 322, 297, 248, 225, 200, 172, 155 bp (Amplifizierungsprodukt B)*

3. Hybridisierung - 2 Teststrips pro Probe (45°C; Schüttelwasserbad)

Befüllen Sie das Wasserbad bis etwa zur halben Höhe eines Typing Trays.

Heizen Sie das Wasserbad auf exakt 45°C (± 0,5°C) auf. Überprüfen Sie die Wassertemperatur mit einem geeichten Thermometer.

Wärmen Sie Hybridization Buffer und Wash Solution A auf 45°C vor. (Achten Sie darauf dass sämtliche bei 2-8°C gebildeten Trübungen vollständig aufgelöst werden.)

Bringen Sie Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B und Color Developer auf Raumtemperatur. Stellen Sie Typing Tray(s) bereit.

Entnehmen Sie mit Hilfe einer sauberen Pinzette für jede Probe einen Teststrip A und einen Teststrip B. (Berühren Sie Teststrips nur mit Handschuhen!) Beschriften Sie die Teststrips ausserhalb der Markerlinien mit einem Bleistift. (Keine Kugelschreiber, Filzstifte, etc.)

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

- **10 µl DNAT** (blauer Deckel) in die untere Ecke jeder Vertiefung, die in den Typing Trays benutzt werden soll, pipettieren.
- **10 µl Amplifizierungsprodukt A** zum entsprechenden DNAT Tropfen zugeben.
 Mit Hilfe einer Pipette gründlich durchmischen. *(Die Lösung bleibt dabei blau gefärbt.)*

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

- **10 µl DNAT** (blauer Deckel) in die untere Ecke jeder Vertiefung, die in den Typing Trays benutzt werden soll, pipettieren.
- **10 µl Amplifizierungsprodukt B** zum entsprechenden DNAT Tropfen zugeben.
 Mit Hilfe einer Pipette gründlich durchmischen. *(Die Lösung bleibt dabei blau gefärbt.)*

- **5 min.** bei Raumtemperatur stehen lassen.
- **1 ml Hybridization Buffer** (vorgewärmt auf 45°C) in jede Vertiefung zugeben.
 Das Typing Tray vorsichtig hin- und herbewegen. *(Die blaue Färbung verschwindet dabei.)*
- **Teststrip A** oder **Teststrip B** mit der markierten Seite nach oben (Linien sichtbar!) in die entsprechenden Vertiefungen einlegen und vollständig untertauchen.
- **30 min.** bei **45°C** auf der Schüttelplattform des Wasserbads inkubieren.
Eine mässige Schüttelfrequenz (ca. 50 U/min) einstellen um ein Überlaufen zu verhindern. Deckel des Wasserbads geschlossen halten um Temperaturschwankungen zu vermeiden.
- Am Ende der Inkubation Hybridisierlösungen mittels Vakuumabsaugung entfernen.
Fahren Sie zügig fort. Achten Sie darauf dass die Teststrips während des gesamten Ablaufs nicht austrocknen.

4. Stringente Waschschritte (45°C; Schüttelwasserbad)

- **1 ml Wash Solution A** (vorgewärmt auf 45°C) zugeben. Kurz (10 sec.) schwenken. Flüssigkeiten mittels Vakuumbaumabsaugung entfernen.
- **1 ml Wash Solution A** (45°C) zugeben.
- **15 min.** bei **45°C** im Schüttelwasserbad inkubieren. Flüssigkeiten mittels Vakuumbaumabsaugung entfernen.
- **1 ml Wash Solution A** (45°C) zugeben.
- **15 min.** bei **45°C** im Schüttelwasserbad inkubieren. Flüssigkeiten mittels Vakuumbaumabsaugung entfernen.

5. Farbentwicklung (Raumtemperatur)

- **1 ml Conjugate Solution** zugeben.
- **15 min.** bei **Raumtemperatur** auf einer Wippe oder einem Kreisschüttler inkubieren. Flüssigkeiten mittels Vakuumbaumabsaugung entfernen.
- **1 ml Wash Solution B** zugeben. Kurz (10 sec.) schwenken. Flüssigkeiten mittels Vakuumbaumabsaugung entfernen.
- **1 ml Wash Solution B** zugeben.
- **5 min.** bei **Raumtemperatur** auf einer Wippe oder einem Kreisschüttler inkubieren. Flüssigkeiten mittels Vakuumbaumabsaugung entfernen.
- **1 ml Wash Solution B** zugeben.
- **5 min.** bei **Raumtemperatur** auf einer Wippe oder einem Kreisschüttler inkubieren. Flüssigkeiten mittels Vakuumbaumabsaugung entfernen.
- **1 ml Color Developer** zugeben.
- **15 min.** bei **Raumtemperatur** im Dunkeln auf einer Wippe oder einem Kreisschüttler inkubieren.
Bei positiver Reaktion erscheint dabei eine violette Färbung.
- Teststrips mehrmals mit destilliertem Wasser spülen.
Anschliessend Teststrips im Dunkeln auf Saugpapier trocknen lassen.
Setzen Sie Teststrips nach der Farbentwicklung keiner intensiven Lichtstrahlung aus.

VI. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

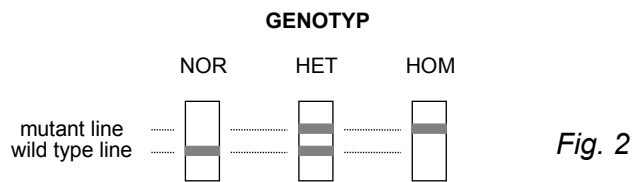
Der Genotyp einer Probe wird jeweils aus den entsprechenden Teststrips A und B mit Hilfe des beiliegenden Collector™ Blattes ermittelt.

Legen Sie die beiden entwickelten Teststrips in die vorgesehenen Felder, richten Sie sie entlang der schematischen Zeichnung mit Hilfe der roten (oben) und grünen bzw. blauen (unten) Markerlinie aus, und fixieren Sie sie mit Klebeband.

Ein positives Signal der obersten Control Linie zeigt das einwandfreie Funktionieren von Conjugate Solution und Color Developer an. Diese Linie sollte immer positiv reagieren.

Für jede polymorphe Position sollte eines der folgenden Färbemuster erhalten werden:

Achtung: Farbintensitäten der positiven Linien können variieren. Dies ist ohne Bedeutung für das Ergebnis.



	Linie "wild type"	Linie "mutant"	Genotyp
NOR	positiv	negativ	normal
HET	positiv	positiv	heterozygot
HOM	negativ	positiv	homozygot mutiert

Siehe Beispiele von StripAssay Ergebnissen auf Seite III (Fig. 3).

Einige der vom CF StripAssay® EXT erfassten Punktmutationen liegen innerhalb weniger Nukleotide am CFTR Gen. Auf den Teststrips werden diese von einer gemeinsame "wild type" Sonde abgedeckt, sodass die 38 Mutationen nur durch 29 "wild type" Sonden vertreten sind.

Linie	"wild type" Sonde	Mutation
22	codon 507 to 508	I507del (-ATC), F508del (-CTT)
26	codon 551 to 553	G551D, R553X
29	2183 to 2184	2183AA>G, 2184delA, 2184insA
31	codon 1158 to 1162	R1158X, R1162X
55	codon 85 and 394	G85E, 394delTT
56	codon 92	E92X, E92K
60	codon 334 to 336	R334W, I336K
61	codon 347	R347H, R347P

Bei Proben, die gemischt heterozygot für zwei dieser Mutationen (z.B. I507del + F508del oder G551D + R553X) sind, fehlt das gemeinsame "wild type" Signal (siehe Beispiel G, Seite III).

Bei Proben, die homozygot für CFTRdel2,3 sind, fehlen zusätzlich die "wild type" Signale für codon 60 und für codon 85 und 394 (siehe Beispiel F, Seite III).

Die nicht-pathogenen Varianten I506V, I507V und F508C verursachen keine Interferenzen bei der Testung und erscheinen als CFTR Wildtyp im CF StripAssay®.

Ratschläge zur Problembeseitigung erhalten Sie durch Kontaktaufnahme mit ViennaLab über den lokalen Distributor oder direkt unter der auf Seite I angegebenen Adresse.

VII. QUALITÄTSÜBERLEGUNGEN

- Gründliches Verständnis des hier beschriebenen Verfahrens, sowie präzise Laborausrüstung und Techniken sind erforderlich um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Die Verwendung des StripAssays für humane *in vitro* Diagnostik ist ausschliesslich entsprechend ausgebildetem Laborpersonal vorbehalten.
- Verwenden Sie StripAssay Komponenten nicht nach dem auf dem Schachteletikett aufgedruckten Ablaufdatum. Mischen Sie keine Reagenzien aus unterschiedlichen Lots.
- Vermeiden Sie mikrobielle Kontamination und Querverunreinigung von Reagenzien und Proben, indem Sie durchgehend sterile Einweg-Pipettenspitzen verwenden. Vertauschen Sie keine Flaschenverschlüsse.
- Die Control Linie auf jedem Teststrip ermöglicht eine Funktionskontrolle des Farb-Detektionssystems. Um die Spezifität der Hybridisier- und Waschschriffe zu überwachen und zu bestätigen, sollten bei jedem einzelnen Experiment Kontroll-DNAs mit bekanntem Genotyp mitgeführt werden.

VIII. SICHERHEIT

- In den vorgesehenen Arbeitsräumen ist Essen, Trinken und Rauchen, sowie die Anwendung von Kosmetika untersagt. Tragen Sie Labormäntel und Einweghandschuhe wenn Sie Proben und Reagenzien handhaben. Waschen Sie sich anschliessend gründlich die Hände.
- Behandeln Sie Proben als potentiell infektiös. Säubern und desinfizieren Sie alle Materialien und Oberflächen gründlich, die mit Proben in Kontakt waren. Entsorgen Sie sämtlichen Müll in Zusammenhang mit klinischen Proben in spezielle Müllcontainer für biologische Risikoabfälle.
- Bringen Sie DNAT nicht in Berührung mit Haut, Augen und Schleimhäuten. Falls dennoch Kontakt erfolgt, waschen Sie es sofort mit viel Wasser ab. Sollten Sie DNAT verschütten, verdünnen Sie es vor dem Aufwischen mit Wasser.
- Befolgen Sie alle gültigen lokalen und staatlichen Sicherheits- und Umweltbestimmungen.

Instructions

I. UTILISATION

Coffret pour l'identification des mutations génétiques de Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), basé sur la réaction en chaîne de polymérase (PCR) et l'hybridation réverse. *Pour le diagnostic humaine in vitro.*

II. METHODE

Trois étapes sont incluses à la procédure: (1) isolation de l'ADN, (2) amplification PCR en utilisant des primers biotinylés, (3) hybridisation des produits d'amplification sur bandelettes contenant des sondes allèle-spécifiques, immobilisées sur un arrangement de bandes parallèles (fig. 1). Des séquences biotinylées liées à la bandelette sont détectées en utilisant de la streptavidine-phosphatase alcaline et des substrats chromogènes.

Le test comprend 38 mutations et 1 polymorphisme du gène CFTR: CFTRdel2,3 (21kb), I507del (-ATC), F508del (-CTT), 1677delTA, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, 2043delG, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 2184insA, 2789+5G>A, R1158X, R1162X, 3659delC, 3905insT, W1282X, N1303K [Teststrip A]; E60X, G85E, 394delTT, E92X, E92K, R117H, 621+1G>T, 1078delT, R334W, I336K, R347H, R347P, A455E, 3120+1G>A, 3272-26A>G, Y1092X, M1101K, 3849+10kbC>T, IVS8 5T/7T/9T [Teststrip B].

D'autres informations d'ordre génétique se trouvent chez OMIM Online Mendelian Inheritance in Man: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

III. CONTENU DU COFFRET

Voir page I pour la liste des composants du coffret.

« DNAT » contient 1.6% NaOH.

 Attention

H315: Provoque une irritation cutanée

H319: Provoque une sévère irritation des yeux

P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage

P337 + P313: Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin

« Amplification Mix », « Taq Dilution Buffer », « Conjugate Solution » et « Wash Solution B » contiennent 0.05% NaN₃. « Conjugate Solution » contient de la streptavidine-phosphatase alcaline. « Color Developer » contient du Nitro Bleu de Tetrazolium (NBT) et du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP).

Conserver tous les réactifs à 2-8°C jusqu'à l'utilisation !

IV. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

En plus de l'équipement standard d'un laboratoire de biologie moléculaire le matériel suivant est nécessaire:

- Thermocycleur et bandelettes ou tubes à réaction à parois minces adéquats
- Bain-marie avec agitateur et température réglable (45°C ± 0.5°C)
- Appareil pour l'aspiration à vide
- Agitateur (agitateur basculant ou rotatif)
- *Facultatif: équipement pour l'électrophorèse sur gel d'agarose (pour le contrôle des produits d'amplification)*

V. PROCEDURE

1. Isolation de l'ADN

Utiliser du sang frais ou congelé prélevé sur EDTA ou anticoagulant citraté; éviter le sang contenant de l'héparine.

Ne pas conserver le sang pendant plus de 3 jours à température ambiante ou plus d'une semaine à 2-8°C avant usage. Le sang conservé pendant plus d'un an au congélateur, ou congelé et décongelé plus d'une fois n'est pas approprié à ce procédé.

Amener les échantillons de sang à température ambiante. Bien mixer en retournant avec précaution plusieurs fois les tubes à prélèvement. Agiter chaque fois avant le prélèvement d'un aliquot de sang.

Amener la « Lysis Solution » et le « GEN^XTRACT Resin » à température ambiante.

- Pipeter **100 µl** d'échantillon de sang dans un microtube de 1.5 ml à couvercle fileté.
- Ajouter **1 ml** de « Lysis Solution », fermer le tube et agiter en retournant plusieurs fois.
- Laisser reposer pendant **15 min** à température ambiante.
- Centrifuger pendant **5 min** à **3'000 rpm** (env. 1'000 x g) dans une micro-centrifugeuse.
- Enlever et éliminer 1 ml de la partie supérieure du surnageant
- Ajouter **1 ml** de « Lysis Solution », fermer le tube et agiter en retournant plusieurs fois.
- Centrifuger pendant **5 min** à **12'000 rpm** (env. 12'000 x g) dans une micro-centrifugeuse.
- Enlever et éliminer le surnageant à l'exception d'environ 50 µl d'un culot cellulaire.
- Remettre en suspension le « GEN^XTRACT Resin » en agitant le flacon soigneusement.
- Ajouter **200 µl** de « GEN^XTRACT Resin » au culot.

Fermer le tube et vortexer pendant 10 sec.

⚠ « GEN^XTRACT Resin » sédimente vite. Répéter la remise en suspension à chaque traitement d'un nouveau aliquot.

- Incuber pendant **20 min** à **56°C**. Vortexer pendant 10 sec.
- Incuber pendant **10 min** à **98°C**. Vortexer pendant 10 sec.
- Centrifuger pendant **5 min** à **12'000 rpm** dans une micro-centrifugeuse. Refroidir sur de la glace pilée.

Le surnageant résultant contient de la matrice d'ADN approprié à l'usage immédiat avec PCR. Pour un stockage ultérieur, transférer le surnageant dans un nouveau tube et garder au frais (à 2-8°C jusqu'à une semaine) ou congelé (à -20°C).

2. Amplification *In Vitro* (PCR; 2 réactions individuelles par échantillon)

Tenir tous les réactifs PCR et la matrice d'ADN au frais pendant la procédure. Exécuter toutes les étapes jusqu'au commencement du programme du thermocycleur sur glace pilée (0-4°C).

- Préparer une nouvelle solution de travail (1:25, concentration finale 0.2 U/µl) de « HS Taq DNA Polymerase » (couvercle rouge) dans du « Taq Dilution Buffer » (couvercle transparent).
- Préparer deux tubes à réaction par échantillon à amplifier. Placer les tubes sur glace pilée.
- Préparer sur glace 2 mixes de réaction PCR (A et B) finales par échantillon:

15 µl Amplification Mix A (couvercle jaune)	et	15 µl Amplification Mix B (couvercle vert)
5 µl HS Taq DNA Polymerase diluée (1U)		5 µl HS Taq DNA Polymerase diluée (1U)
5 µl matrice d'ADN		5 µl matrice d'ADN

Si de la matrice d'ADN préparé autrement que selon le protocole d'isolation de ce coffret (chapitre V/1) est utilisé, une série de concentrations ADN de 2-20 µg/ml (= 10-100 ng DNA par réaction) est recommandée.

- Bien fermer les tubes. Préchauffer le thermocycleur à 94°C.
- Introduire les tubes à réaction et dérouler le programme thermocycleur comme suit:
 - pré-PCR: 94°C/3 min
 - thermocyclage: 94°C/15 sec - 60°C/45 sec - 72°C/1 min. (35 cycles)
 - extension finale: 72°C/3 min

Conserver les produits d'amplification sur glace ou à 2-8°C pour un usage ultérieur.

Facultatif: Analyser les produits d'amplification par gel électrophorèse (p.ex. 3% gel d'agarose).

Longueur des fragments: 472, 345, 315, 278, 257, 236/213, 194, 165 bp (produit d'amplification A)
386, 350, 322, 297, 248, 225, 200, 172, 155 bp (produit d'amplification B)

3. Hybridisation - 2 « Teststrips » par échantillon (45°C; bain-marie agitant)

Ajuster le niveau d'eau du bain-marie à environ ½ de la hauteur du plateau de typage.

Chauffer le bain-marie à exactement 45°C (± 0.5°C). Contrôler la température d'eau avec un thermomètre calibré.

Préchauffer « Hybridization Buffer » et « Wash Solution A » à 45°C. (Attention: Toutes les précipitations formées à 2-8°C doivent être complètement solubilisées.)

Amener les « Teststrips », le « DNAT », le « Conjugate Solution », la « Wash Solution B » et le « Color Developer » à température ambiante. Préparer les plateaux de typage.

Sortir une « Teststrip A » et une « Teststrip B » par échantillon de l'emballage en utilisant des pinces propres. (Ne toucher les « Teststrips » qu'avec des gants!) Etiqueter les « Teststrips » en dehors des bandes de marquage avec un crayon. (Pas de stylo à bille, pas de marqueurs etc.)

Pour tous les « **Teststrips A** » (un couloir par échantillon):

- Pipeter **10 µl** de « **DNAT** » (couvercle bleu) au bas de chaque couloir prévu pour l'utilisation dans les plateaux de typage.
- Ajouter **10 µl** de **produit d'amplification A** à la goutte correspondante de « **DNAT** ». Mélanger soigneusement en utilisant une pipette. (La solution restera bleue.)

Pour tous les « **Teststrips B** » (un couloir par échantillon):

- Pipeter **10 µl** de « **DNAT** » (couvercle bleu) au bas de chaque couloir prévu pour l'utilisation dans les plateaux de typage.
- Ajouter **10 µl** de **produit d'amplification B** à la goutte correspondante de « **DNAT** ». Mélanger soigneusement en utilisant une pipette. (La solution restera bleue.)

- Laisser pendant **5 min** à température ambiante.
- Ajouter **1 ml** de « **Hybridization Buffer** » (préchauffé à 45°C) à chaque couloir. Agiter le plateau délicatement. (La couleur bleue disparaîtra.)
- Insérer le « **Teststrip A** » ou le « **Teststrip B** » avec la face marquée vers le haut (bandes visibles!) aux compartiments correspondants. Immerger complètement.
- Incuber pendant **30 min** à **45°C** sur la plaque d'agitation du bain-marie. Mettre une fréquence d'agitation modérée (env. 50 rpm) pour éviter les pertes. Laisser fermé le couvercle du bain-marie pour éviter des variations de température.
- A la fin de l'incubation, enlever les solutions d'hybridisation par aspiration à vide. Continuer immédiatement. Éviter l'assèchement des « **Teststrips** » durant la totalité de la procédure.

4. Lavage rigoureux (45°C; bain-marie agitant)

- Ajouter **1 ml** de « **Wash Solution A** » (préchauffé à 45°C). Rincer brièvement (10 sec). Enlever les liquides par aspiration à vide.
- Ajouter **1 ml** de « **Wash Solution A** » (45°C).
- Incuber pendant **15 min** à **45°C** dans le bain-marie. Enlever les liquides par aspiration à vide.
- Ajouter **1 ml** de « **Wash Solution A** » (45°C).
- Incuber pendant **15 min** à **45°C** dans le bain-marie. Enlever les liquides par aspiration à vide.

5. Développement de la coloration (température ambiante)

- Ajouter **1 ml** de « **Conjugate Solution** ».
- Incuber pendant **15 min** à **température ambiante** sur un agitateur basculant ou rotatif. Enlever les liquides par aspiration à vide.
- Ajouter **1 ml** de « **Wash Solution B** ». Rincer brièvement (10 sec). Enlever les liquides par aspiration à vide.
- Ajouter **1 ml** de « **Wash Solution B** ».
- Incuber pendant **5 min** à **température ambiante** sur un agitateur basculant ou rotatif. Enlever les liquides par aspiration à vide.
- Ajouter **1 ml** de « **Wash Solution B** ».
- Incuber pendant **5 min** à **température ambiante** sur un agitateur basculant ou rotatif. Enlever les liquides par aspiration à vide.
- Ajouter **1 ml** de « **Color Developer** ».
- Incuber pendant **15 min** à **température ambiante** à l'obscurité sur un agitateur basculant ou rotatif
Une couleur pourpre apparaîtra comme résultat d'une réaction positive.
- Laver les « Teststrips » plusieurs fois avec de l'eau distillée.
Laisser sécher les « Teststrips » à l'obscurité sur du papier absorbant.
Eviter d'exposer les « Teststrips » à la pleine lumière après le développement de la coloration.

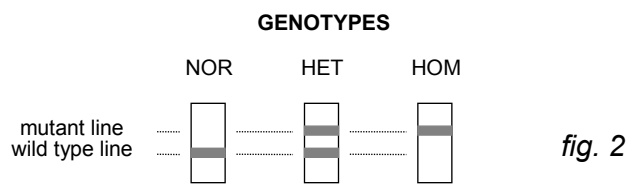
VI. INTERPRETATION DES RESULTATS

Le génotype d'un échantillon est déterminé à partir des « Teststrips » A et B correspondantes en utilisant le « Collector™ » inclus au coffret.

Placer les deux « Teststrips » traité dans zones désignées, aligner sur le schéma en utilisant la bande de marquage rouge (en haut) et la bande de marquage verte/bleue (en bas), et fixer avec du ruban adhésif.

Une réaction positive de la bande de contrôle tout en haut indique le bon fonctionnement des réactifs « Conjugate Solution » et « Color Developer ». Cette bande devrait toujours être colorée positive.

Pour chaque position polymorphique, un des types de coloration suivants devrait être obtenu:
Note: Les intensités de coloration des bandes positives peuvent varier. Cela est sans aucune importance pour le résultat.



	bande « wild type »	bande « mutant »	génotype
NOR	positive	négative	normal
HET	positive	positive	hétérozygote
HOM	négative	positive	mutation homozygote

Voir exemples des résultats du StripAssay sur page III (fig. 3).

Certaines mutations ponctuelles détectées par le CF StripAssay® EXT sont localisées sur le gène CFTR à quelques nucléotides les unes des autres. Elles sont représentées sur les « Teststrips » par une sonde « wild type » collective, autant dire que les 38 mutations ne sont couvertes que par 29 sondes « wild type ».

bande	sonde « wild type »	mutation
22	codon 507 to 508	I507del (-ATC), F508del (-CTT)
26	codon 551 to 553	G551D, R553X
29	2183 to 2184	2183AA>G, 2184delA, 2184insA
31	codon 1158 to 1162	R1158X, R1162X
55	codon 85 and 394	G85E, 394delTT
56	codon 92	E92X, E92K
60	codon 334 to 336	R334W, I336K
61	codon 347	R347H, R347P

Des échantillons hétérozygotes composés de deux de ces mutations (p.ex. I507del + F508del ou G551D + R553X) ne présenteront pas de signal « wild type » commun (voir exemple G, page III).

Pour les échantillons qui sont homozygotes CFTRdel2,3, il manquera de plus le signal « wild type » pour codon 60 et pour codon 85 et 394 (voir exemple F, page III).

Les polymorphismes bénins I506V, I507V et F508C du gène CFTR ne causent aucune interférence dans l'analyse et seront considérés comme des allèles sauvages (wildtype) sur le CF StripAssay®.

Des conseils sur les erreurs constatées peuvent être obtenus en contactant ViennaLab par l'intermédiaire du distributeur local ou directement sous l'adresse qui se trouve sur page I.

VII. PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Une compréhension détaillée de la procédure décrite ici, ainsi qu'un équipement de laboratoire et des techniques précises sont nécessaires pour obtenir des résultats fiables. L'usage du StripAssay pour le diagnostic *in vitro* humain doit être limité au personnel bien entraîné.
- Ne pas utiliser des composants des StripAssay au-delà de la date de péremption imprimée sur le coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.
- Utiliser des embouts de pipette stériles et jetables pendant toute la procédure pour éviter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs et échantillons. Ne pas échanger les couvercles des flacons.
- La bande de contrôle immobilisée sur chaque « Teststrip » permet un contrôle performant du système de détection chromogénique. Pour surveiller et valider la spécificité des étapes de l'hybridation et du lavage, des contrôles ADN d'un génotype connu devraient être inclus à chaque expérience individuelle.

VIII. SECURITE

- Ne pas boire, manger ou appliquer des cosmétiques dans les secteurs réservés au travail. Porter des blouses de laboratoire et des gants à usage unique pendant le travail avec des échantillons et des réactifs. Se laver les mains soigneusement après la procédure.
- Traiter des échantillons comme tous produits potentiellement capables de communiquer des agents infectieux. Soigneusement nettoyer et désinfecter tout matériel et toutes surfaces qui ont été en contact avec des échantillons. Eliminer tous déchets associés avec des échantillons cliniques dans un container prévu à cet effet.
- Eviter tout contact du « DNAT » avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement avec beaucoup d'eau. Si le produit est renversé, diluer avec de l'eau avant d'essuyer.
- Se référer à toutes les réglementations locales et fédérales en cours sur l'environnement.

Istruzioni per l'uso

I. UTILIZZO

Saggio per l'identificazione delle mutazioni del gene Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) basato sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) e sull'ibridazione inversa. *Per diagnostica umana in vitro.*

II. METODICA

La procedura si articola in tre passaggi: (1) isolamento del DNA, (2) amplificazione tramite PCR con primer biotinilati, (3) ibridazione dei prodotti amplificati su strisce contenente sonde oligonucleotidiche allele-specifiche immobilizzate secondo uno schema di bande parallele (Fig. 1). Le sequenze biotinate legate alle sonde sono rivelate utilizzando fosfatasi alcalina coniugata con streptavidina e, in seguito, il relativo substrato.

Il saggio identifica 38 mutazioni e 1 polimorfismo nel gene CFTR: CFTRdel2,3 (21kb), I507del (-ATC), F508del (-CTT), 1677delTA, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, 2043delG, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 2184insA, 2789+5G>A, R1158X, R1162X, 3659delC, 3905insT, W1282X, N1303K [Teststrip A]; E60X, G85E, 394delTT, E92X, E92K, R117H, 621+1G>T, 1078delT, R334W, I336K, R347H, R347P, A455E, 3120+1G>A, 3272-26A>G, Y1092X, M1101K, 3849+10kbC>T, IVS8 5T/7T/9T [Teststrip B].

Ulteriori informazioni sono disponibili su OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

III. COMPONENTI DEL KIT

Vedi la lista di tutti i componenti a pagina I.

DNAT contiene 1.6% NaOH.

⚠ Attenzione

H315: Provoca irritazione cutanea

H319: Provoca grave irritazione oculare

P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso

P337 + P313: Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico

Amplification Mix, Taq Dilution Buffer, Conjugate Solution, Wash Solution B contiene 0.05% NaN_3 . Conjugate Solution contiene fosfatasi alcalina coniugata con streptavidina. Color Developer contiene nitro blue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP).

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C quando non sono utilizzati !

IV. MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

Oltre all'equipaggiamento standard per il laboratorio di biologia molecolare, è anche necessario:

- Termociclatore e provette idonee per reazione in plastica sottile
- Bagnomaria con piastraforma basculante e temperatura regolabile ($45^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$)
- Pompa o sistema analogo aspirante
- Agitatore (orizzontale o orbitale)
- *Opzionale: linea elettroforetica su gel di agarosio (per il controllo dei prodotti di amplificazione)*

V. PROCEDURA

1. Isolamento del DNA

Utilizzare sangue fresco o congelato con EDTA o citrato come anticoagulante; non usare sangue contenente eparina.

Non conservare il sangue per più di 3 giorni a temperatura ambiente o per più di 1 settimana a 2-8°C prima dell'uso. Il sangue tenuto congelato per più di 1 anno, o sottoposto a più di 3 cicli di congelamento/scongelo non è adatto per essere utilizzato in questa procedura.

Portare i campioni di sangue a temperatura ambiente. Miscelare invertendo delicatamente più volte le provette di raccolta del sangue. Ripetere la miscelazione prima di prelevare ogni aliquota di sangue.

Lasciare che Lysis Solution e GEN^XTRACT Resin raggiungano la temperatura ambiente.

- Pipettare **100 µl** di **campione di sangue** in una provetta da 1.5 ml con tappo a vite.
- Aggiungere **1 ml Lysis Solution**, chiudere la provetta e miscelare per inversione diverse volte.
- Lasciare per **15 min.** a temperatura ambiente.
- Centrifugare per **5 min.** a **3,000 rpm** (ca. 1,000 x g) in una microcentrifuga.
- Rimuovere ed eliminare dalla parte superiore 1 ml di surnatante.
- Aggiungere **1 ml Lysis Solution**, chiudere la provetta e miscelare per inversione diverse volte.
- Centrifugare per **5 min.** a **12,000 rpm** (ca. 12,000 x g) in una microcentrifuga.
- Rimuovere ed eliminare il surnatante lasciando circa 50 µl di pellet visibile.
- Risospendere GEN^XTRACT Resin agitando vigorosamente la bottiglia.
- Aggiungere **200 µl GEN^XTRACT Resin** al pellet. Chiudere la provetta e vortexare per 10 sec.
- **⚠ GEN^XTRACT Resin si deposita rapidamente. Ripetere la risospensione ogni volta immediatamente prima di prelevare un'altra aliquota.**
- Incubare per **20 min.** a **56°C**. Vortexare per 10 sec.
- Incubare per **10 min.** a **98°C**. Vortexare per 10 sec.
- Centrifugare per **5 min.** a **12,000 rpm** in una microcentrifuga. Raffreddare in ghiaccio.

Il surnatante ottenuto contiene DNA idoneo per un uso immediato in PCR. Per essere conservato, il surnatante dovrebbe essere trasferito in una nuova provetta e tenuto refrigerato (2-8°C; fino a una settimana) o congelato a -20°C.

2. Amplificazione *In Vitro* (PCR; 2 reazioni separate per ogni campione)

Conservare tutti i reagenti per la PCR e i DNA estratti refrigerati. Condurre tutti i passaggi fino alla partenza del programma del termociclatore in ghiaccio (0-4°C).

- Preparare una diluizione fresca (1:25, conc. finale 0.2 U/µl) di **HS Taq DNA Polymerase** (tappo rosso) nel **Taq Dilution Buffer** (tappo trasparente).
- Preparare 2 provette di reazione per ogni campione da amplificare. Mettere le provette in ghiaccio.
- Per ogni campione preparare 2 mix di reazione per PCR (A e B) in ghiaccio:

15 µl Amplification Mix A (tappo giallo)	e	15 µl Amplification Mix B (tappo verde)
5 µl HS Taq DNA Polymerase diluita (1U)		5 µl HS Taq DNA Polymerase diluita (1U)
5 µl DNA template		5 µl DNA template

Se i DNA estratti non sono stati ottenuti secondo il protocollo fornito (capitolo V/1), si raccomanda una concentrazione di DNA in un range di 2-20 µg/ml (= 10-100 ng DNA per reazione).

- Chiudere bene le provette. Preriscaldare il termociclatore a 94°C.
- Inserire le provette e far partire il seguente programma:
 - pre-PCR: 94°C/3 min.
 - cicli: 94°C/15 sec. - 60°C/45 sec. - 72°C/1 min. (35 cicli)
 - estensione finale: 72°C/3 min.

Conservare i prodotti amplificati in ghiaccio o a 2-8°C per utilizzi futuri.

Opzionale: Analizzare i prodotti di amplificazione con elettroforesi su gel (e.g. 3% agarose gel).

Lunghezze dei frammenti: 472, 345, 315, 278, 257, 236/213, 194, 165 bp (prodotto amplificazione A)

386, 350, 322, 297, 248, 225, 200, 172, 155 bp (prodotto amplificazione B)

3. Ibridazione - 2 Teststrips per campione (45°C; bagnomaria basculante)

Regolare il livello dell'acqua a circa ½ dell'altezza del Typing Tray (vassoio porta strisce).

Scaldare il bagnomaria esattamente a 45°C (± 0.5°C). Controllare la temperatura dell'acqua con un termometro calibrato.

Preriscaldare Hybridization Buffer e Wash Solution A a 45°C. (Assicurarsi che tutti i precipitati formati a 2-8°C siano completamente disciolti.)

Lasciare che Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B e Color Developer raggiungano la temperatura ambiente. Preparare Typing Tray(s).

Prendere una Teststrip A e una Teststrip B per ogni campione utilizzando pinzette pulite. (Toccare le Teststrip solo coi guanti!) Contrassegnare le Teststrip oltre le linee colorate con una matita. (Non penne a sfera, pennarelli, ecc.)

*Per tutte le **Teststrips A** (una corsia per campione):*

- Pipettare **10 µl DNAT** (tappo blu) nell'angolo in basso di ogni corsia del Typing Trays.
- Aggiungere **10 µl amplification product A** nella corrispondente goccia di DNAT. Miscelare bene con una pipetta. *(La soluzione rimarrà blu.)*

*Per tutte le **Teststrips B** (una corsia per campione):*

- Pipettare **10 µl DNAT** (tappo blu) nell'angolo in basso di ogni corsia del Typing Trays.
- Aggiungere **10 µl amplification product B** nella corrispondente goccia di DNAT. Miscelare bene con una pipetta. *(La soluzione rimarrà blu.)*

- Incubare per **5 min.** a temperatura ambiente.
- Aggiungere **1 ml Hybridization Buffer** (preriscaldato a 45°C) in ogni corsia. Agitare delicatamente il vassoio. *(Il colore blu scomparirà.)*
- Inserire la **Teststrip A** o la **Teststrip B** con il lato contrassegnato verso l'alto (linee visibili!) nelle rispettive corsie. Immergere completamente.
- Incubare per **30 min.** a **45°C** nella piattaforma basculante del bagnomaria. *Selezionare una frequenza di agitazione moderata (ca. 50 rpm) per evitare fuoriuscita del liquido. Tenere il coperchio del bagnomaria chiuso per evitare variazioni di temperatura.*
- Alla fine dell'incubazione rimuovere la soluzione di ibridazione tramite aspirazione a vuoto. *Procedere immediatamente. Non fare seccare le Teststrip durante l'intera procedura.*

4. Lavaggio stringente (45°C; bagnomaria basculante)

- Aggiungere **1 ml Wash Solution A** (preriscaldata a 45°C). Lavare brevemente (10 sec.). Rimuovere i liquidi tramite aspirazione a vuoto.
- Aggiungere **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Incubare per **15 min.** a **45°C** nel bagnomaria basculante. Rimuovere i liquidi tramite aspirazione a vuoto.
- Aggiungere **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Incubare per **15 min.** a **45°C** nel bagnomaria basculante. Rimuovere i liquidi tramite aspirazione a vuoto.

5. Sviluppo del colore (temperatura ambiente)

- Aggiungere **1 ml Conjugate Solution**.
- Incubare per **15 min.** a **temperatura ambiente** su un agitatore orizzontale o orbitale. Rimuovere i liquidi tramite aspirazione a vuoto.
- Aggiungere **1 ml Wash Solution B**. Lavare brevemente (10 sec.). Rimuovere i liquidi tramite aspirazione a vuoto.
- Aggiungere **1 ml Wash Solution B**.
- Incubare per **5 min.** a **temperatura ambiente** su un agitatore orizzontale o orbitale. Rimuovere i liquidi tramite aspirazione a vuoto.
- Aggiungere **1 ml Wash Solution B**.
- Incubare per **5 min.** a **temperatura ambiente** su un agitatore orizzontale o orbitale. Rimuovere i liquidi tramite aspirazione a vuoto.
- Aggiungere **1 ml Color Developer**.
- Incubare per **15 min.** a **temperatura ambiente** al buio su agitatore orizzontale o orbitale. *Una colorazione viola apparirà in corrispondenza di una reazione positiva.*
- Lavare le Teststrip diverse volte con acqua distillata. Lasciare asciugare le Teststrip al buio su carta assorbente. *Non esporre le Teststrip a luce intensa dopo lo sviluppo del colore.*

VI. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

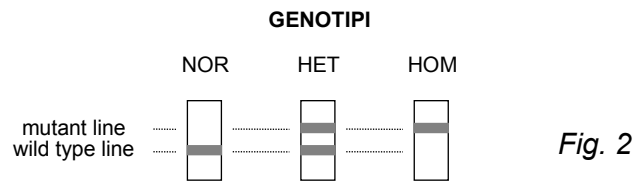
Il genotipo di un campione si determina dalle corrispondenti Teststrips A e B usando il « Collector™ » incluso nel kit.

Mettere le Teststrips sviluppate negli spazi assegnati, allinearle allo schema disegnato utilizzando la linea rossa (alto) e la linea verde o blu (basso) e fissarle con nastro adesivo.

Una reazione positiva nella banda di Controllo in alto indica il corretto funzionamento della Conjugate Solution e del Color Developer. Questa banda deve sempre risultare positiva.

Per ogni posizione polimorfica, si dovrebbe ottenere una delle seguenti combinazioni di colorazione:

Nota: l'intensità di colorazione delle bande positive può variare. Questo non è significativo per il risultato.



	banda « wild type »	banda « mutant »	genotipo
NOR	positivo	negativo	normale
HET	positivo	positivo	eterozigote
HOM	negativo	positivo	omozigote mutante

Vedi esempi dei risultati StripAssay a pagina III (Fig. 3).

Alcune mutazioni puntiformi individuate dalla CF StripAssay® EXT sono distanziate da pochi nucleotidi nel gene della CFTR. Sulle Teststrips queste hanno una sonda wild type comune, quindi 29 sonde wild type sono sufficienti per coprire le 38 mutazioni.

banda	sonda « wild type »	mutazione
22	codon 507 to 508	I507del (-ATC), F508del (-CTT)
26	codon 551 to 553	G551D, R553X
29	2183 to 2184	2183AA>G, 2184delA, 2184insA
31	codon 1158 to 1162	R1158X, R1162X
55	codon 85 and 394	G85E, 394delTT
56	codon 92	E92X, E92K
60	codon 334 to 336	R334W, I336K
61	codon 347	R347H, R347P

Campioni doppi eterozigoti per due di queste mutazioni (es. I507del + F508del o G551D + R553X) non presenteranno il segnale sulla sonda wild type comune (vedi esempio G, pagina III).

Oltre al proprio segnale wild type, i campioni omozigoti del CFTRdel2,3 non presenteranno i segnali wild type per codon 60 i per codon 85 i 394 (vedi esempio F, pagina III).

Le varianti benigne I506V, I507V e F508C non interferiscono e appariranno come wild type nel CF StripAssay®.

Consigli sulla soluzione dei problemi possono essere ottenuti contattando il distributore locale della ViennaLab. In alternativa ci si può rivolgere direttamente all'indirizzo fornito a pagina I.

VII. CONSIDERAZIONI SULLA QUALITA'

- Una piena comprensione della procedura qui esposta e precisi equipaggiamenti e tecniche di laboratorio sono necessari per ottenere risultati affidabili. L'utilizzo del kit StripAssay per la diagnostica umana *in vitro* deve essere limitato a personale correttamente addestrato.
- Non usare i componenti del kit StripAssay oltre la data di scadenza riportata sull'esterno della scatola. Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Per evitare contaminazioni microbiche e cross-contaminazione dei reagenti o dei campioni utilizzare solo consumabili e puntali sterili. Non scambiare i tappi delle bottiglie tra di loro.
- La banda di controllo immobilizzata su ogni Teststrip consente un controllo di qualità del sistema di rivelazione colorimetrico. Per tenere sotto controllo e garantire la specificità dell'ibridazione e dei lavaggi, uno o più DNA di controllo a genotipo noto dovrebbero essere inseriti in ogni esperimento.

VIII. SICUREZZA

- Non bere, mangiare, fumare o utilizzare cosmetici nelle apposite aree di lavoro. Indossare camici da laboratorio e guanti usa e getta quando si maneggiano i campioni e i reagenti del kit. Lavarsi accuratamente le mani alla fine del lavoro.
- Maneggiare tutti i campioni come se questi potessero trasmettere malattie infettive. Pulire e disinfettare accuratamente tutto il materiale e le superfici che sono entrati in contatto con i campioni. Eliminare tutti gli scarti inerenti i campioni in appositi contenitori per rischio biologico.
- Evitare il contatto del DNAT con pelle, occhi, o membrane mucose. Se il contatto avviene, lavare immediatamente con grandi quantità d'acqua. Se lo stesso si rovescia, diluire con acqua prima di asciugare.
- Aderire a tutte le regolamentazioni locali e federali che sono applicate in merito ai temi della sicurezza e dell'ambiente.

Instrucciones de uso

I. APLICACIÓN

Ensayo para la identificación de las mutaciones del gen Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación inversa. *Para el diagnóstico humano in vitro.*

II. METODOLOGÍA

El procedimiento incluye tres pasos: (1) aislamiento del ADN, (2) amplificación PCR utilizando primers marcados con biotina, (3) hibridación de los productos de amplificación en tiras que contienen sondas de oligonucleótido alelo-específico fijadas en líneas paralelas (Fig. 1). Las secuencias marcadas con biotina unidas a la tira se detectan utilizando estreptavidina-fosfatasa-alcalina y sustrato de color.

El ensayo incluye 38 mutaciones y 1 polimorfismo del gen CFTR: CFTRdel2,3 (21kb), I507del (-ATC), F508del (-CTT), 1677delTA, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, 2043delG, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 2184insA, 2789+5G>A, R1158X, R1162X, 3659delC, 3905insT, W1282X, N1303K [Teststrip A]; E60X, G85E, 394delTT, E92X, E92K, R117H, 621+1G>T, 1078delT, R334W, I336K, R347H, R347P, A455E, 3120+1G>A, 3272-26A>G, Y1092X, M1101K, 3849+10kbC>T, IVS8 5T/7T/9T [Teststrip B].

Se puede encontrar más información sobre genética en OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

III. COMPONENTES DEL KIT

Véase la lista de todos los componentes del kit en la página I.

El DNAT contiene 1,6% NaOH.

⚠ Atención

H315: Provoca irritación cutánea

H319: Provoca irritación ocular grave

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección

P337 + P313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico

Amplification Mix, Taq Dilution Buffer, Conjugate Solution, Wash Solution B contiene 0,05% NaN₃. Conjugate Solution contiene estreptavidina-fosfatasa alcalina. Color Developer contiene nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP).

¡Conservar todos los reactivos a 2-8°C cuando no se estén utilizando!

IV. MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

Aparte del equipamiento de un laboratorio de biología molecular estándar, se necesita:

- Termociclador y tubos de reacción de plástico fino adecuados.
- Baño de agua con plataforma de agitación y temperatura regulable (45°C ± 0,5°C)
- Aparato de aspiración al vacío
- Agitador (balanceo o agitador orbital)
- *Opcional: equipo de electroforesis en gel de agarosa (para el control de los productos de amplificación)*

V. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Aislamiento del ADN

Utilizar sangre fresca o congelada con EDTA o anticoagulante citrato; evitar sangre que contenga heparina.

No conservar la sangre durante más de tres días a temperatura ambiente o más de 1 semana a 2-8°C antes de utilizarla. La sangre que se ha mantenido congelada durante más de un año o que ha pasado más de tres ciclos de congelación-descongelación no se puede utilizar en este procedimiento.

Esperar a que las muestras de sangre alcancen la temperatura ambiente. Mezclar bien invirtiendo con cuidado los tubos de extracción de sangre varias veces. Repetir el proceso de mezclado cada vez que se vaya a extraer una alícuota de sangre.

Esperar a que la Lysis Solution y la GEN^XTRACT Resin alcancen la temperatura ambiente.

- Pipetear **100 µl** de **sangre** en un microtubo de 1,5 ml con tapón de rosca.
- Añadir **1 ml** de la **Lysis Solution**, cerrar el tubo y mezclar invirtiéndolo varias veces.
- Dejar reposar durante **15 min.** a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante **5 min.** a **3.000 rpm** (aprox. 1.000 x g) en una microcentrífuga.
- Aspirar y desechar la parte superior (1 ml) del sobrenadante.
- Añadir **1 ml** de la **Lysis Solution**, cerrar el tubo y mezclar invirtiéndolo varias veces.
- Centrifugar durante **5 min.** a **12.000 rpm** (aprox. 12.000 x g) en una microcentrífuga.
- Aspirar y desechar el supernadante exceptuando aprox. 50 µl de un precipitado visible y esponjoso.
- Resuspender la GEN^XTRACT Resin agitando el frasco.
- Añadir **200 µl** de **GEN^XTRACT Resin** al precipitado. Cerrar el tubo y mezclar en un agitador tipo vortex durante 10 seg.
- **⚠ La GEN^XTRACT Resin sedimenta rápidamente. Repetir la resuspensión cada vez inmediatamente antes de aspirar otra alícuota.**
- Incubar durante **20 min.** a **56°C**. Mezclar en un agitador tipo vortex durante 10 seg.
- Incubar durante **10 min.** a **98°C**. Mezclar en un agitador tipo vortex durante 10 seg.
- Centrifugar durante **5 min.** a **12.000 rpm** en una microcentrífuga. Enfriar en hielo.

El sobrenadante resultante contiene ADN adecuado para ser utilizado inmediatamente en la PCR. Para conservarlo de cara al futuro, el sobrenadante debería transferirse a un tubo nuevo y guardarse en un frigorífico (a 2-8°C hasta una semana) o en un congelador a -20°C.

2. Amplificación *in vitro* (PCR; 2 reacciones por muestra)

Conservar todos los reactivos PCR y el ADN en frío durante todo el proceso. Realizar todos los pasos hasta el inicio de la amplificación en hielo (0-4°C).

- Preparar una dilución de trabajo fresca (1:25, concentración final de 0,2 U/µl) de **HS Taq DNA Polymerase** (tapón rojo) en **Taq Dilution Buffer** (tapón transparente).
- Preparar 2 tubos de reacción para cada muestra a amplificar. Colocar los tubos en hielo.
- Para cada muestra, preparar 2 mezclas de reacción de PCR final (A y B) en el hielo:

15 µl de Amplification Mix A (tapón amarillo)	y	15 µl de Amplification Mix B (tapón verde)
5 µl de HS Taq DNA Polymerase diluida (1U)		5 µl de HS Taq DNA Polymerase diluida (1U)
5 µl de ADN		5 µl de ADN

Si no se utilizan ADN preparado siguiendo el protocolo de aislamiento del kit (capítulo V/1), se recomienda utilizar un rango de concentración del ADN de 2-20 µg/ml (= 10-100 ng de ADN por reacción).

- Tapar fuertemente los tubos. Precalear el termociclador a 94°C.
- Introducir los tubos de reacción y ejecutar el siguiente programa de termociclado:
Pre-PCR: 94°C/3 min.
Termociclado: 94°C/15 seg. - 60°C/45 seg. - 72°C/1 min. (35 ciclos)
Exensión final: 72°C/3 min.

Conservar los productos de amplificación en hielo a 2-8°C para utilizarlos más adelante.

Opcional: Analizar los productos de amplificación mediante electroforesis en gel (p.e. 3% gel de agarosa).

*Longitudes de fragmento: 472, 345, 315, 278, 257, 236/213, 194, 165 bp (producto de amplificación A)
386, 350, 322, 297, 248, 225, 200, 172, 155 bp (producto de amplificación B)*

3. Hibridación - 2 Teststrips por muestra (45°C; baño de agua con agitación)

Ajustar el nivel de agua del baño a aprox. ½ de la altura de la Typing Tray.

Calentar el baño de agua a exactamente 45°C (± 0,5°C). Comprobar la temperatura del agua con un termómetro calibrado.

Precalear el Hybridization Buffer y la Wash Solution A a 45°C. (Fijarse en que todos los precipitados formados a 2-8°C se disuelvan completamente.)

Esperar a que los Teststrips, el DNAT, la Conjugate Solution, la Wash Solution B y el Color Developer alcancen la temperatura ambiente. Preparar la/s Typing Tray/s.

Extraer un Teststrip A y un Teststrip B para cada muestra utilizando unas pinzas limpias. (¡Tocar siempre los Teststrips con guantes!) Identificar los Teststrips fuera de las líneas marcadas con lápiz. (No utilizar bolígrafos, rotuladores etc.)

*Para todos los **Teststrips A** (un compartimento por muestra):*

- Pipetear **10 µl** de **DNAT** (tapón azul) en la esquina inferior de cada compartimento que se vaya a utilizar en las Typing Trays.
- Añadir **10 µl** del **producto de amplificación A** sobre la gota correspondiente de DNAT. Mezclar bien con una pipeta. *(La solución permanecerá azul.)*

*Para todos los **Teststrips B** (un compartimento por muestra):*

- Pipetear **10 µl** de **DNAT** (tapón azul) en la esquina inferior de cada compartimento que se vaya a utilizar en las Typing Trays.
- Añadir **10 µl** del **producto de amplificación B** sobre la gota correspondiente de DNAT. Mezclar bien con una pipeta. *(La solución permanecerá azul.)*

- Incubar durante **5 min.** a temperatura ambiente.
- Añadir **1 ml** de **Hybridization Buffer** (precalearado a 45°C) en cada compartimento. Agitar la Typing Tray con suavidad. *(Desaparecerá el color azul.)*
- Introducir el **Teststrip A** o el **Teststrip B** con el lado marcado hacia arriba (¡líneas visibles!) en los compartimentos correspondientes. Sumergir completamente.
- Incubar durante **30 min.** a **45°C** en la plataforma de agitación del baño de agua. *Ajustar una frecuencia de agitación moderada (aprox. 50 rpm) para evitar derrames. Mantener cerrada la tapa del baño de agua para evitar variaciones en la temperatura.*
- Al final de la incubación, aspirar las soluciones de hibridación mediante aspiración al vacío.

Hacerlo inmediatamente. No permitir que las tiras se sequen durante el proceso.

4. Lavado riguroso (45°C; baño de agua con agitación)

- Añadir **1 ml** de **Wash Solution A** (precalentada a 45°C). Lavar brevemente (10 seg.). Aspirar los líquidos mediante aspiración al vacío.
- Añadir **1 ml** de **Wash Solution A** (45°C).
- Incubar durante **15 min.** a **45°C** en el baño de agua con agitación. Aspirar los líquidos mediante aspiración al vacío.
- Añadir **1 ml** de **Wash Solution A** (45°C).
- Incubar durante **15 min.** a **45°C** en el baño de agua con agitación. Aspirar los líquidos mediante aspiración al vacío.

5. Revelado del color (temperatura ambiente)

- Añadir **1 ml** de **Conjugate Solution**.
- Incubar durante **15 min.** a **temperatura ambiente** en un agitador de balanceo u orbital. Aspirar los líquidos mediante aspiración al vacío.
- Añadir **1 ml** de **Wash Solution B**. Lavar brevemente (10 seg.). Aspirar los líquidos mediante aspiración al vacío.
- Añadir **1 ml** de **Wash Solution B**.
- Incubar durante **5 min.** a **temperatura ambiente** en un agitador de balanceo u orbital. Aspirar los líquidos mediante aspiración al vacío.
- Añadir **1 ml** de **Wash Solution B**.
- Incubar durante **5 min.** a **temperatura ambiente** en un agitador de balanceo u orbital. Aspirar los líquidos mediante aspiración al vacío.
- Añadir **1 ml** de **Color Developer**.
- Incubar durante **15 min.** a **temperatura ambiente** en la oscuridad en un agitador de balanceo u orbital.
Si se produce una reacción positiva, aparecerá un color morado.
- Lavar varias veces los Teststrips con agua destilada.
Dejar que los Teststrips se sequen en oscuridad sobre papel absorbente.
No exponer los Teststrips a una luz intensa después del revelado del color.

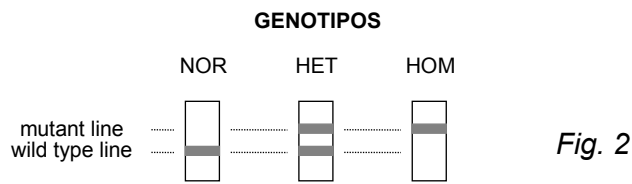
VI. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El genotipo de la muestra se determina a partir de las Teststrips A y B correspondientes utilizando el « Collector™ » suministrada.

Colocar ambas Teststrips procesadas dentro de los campos diseñados, alinearlas con el dibujo esquemático utilizando la línea roja (arriba) y la línea verde o azul (abajo), y pegarlas con cinta adhesiva.

Una reacción positiva de la línea de Control superior indica el funcionamiento correcto de la Conjugate Solution y del Color Developer. Esta línea siempre debería dar positivo.

Para cada posición polimórfica, se debería obtener uno de los siguientes patrones de bandas:
Nota: Las intensidades de las bandas positivas pueden variar. Esto no tiene ningún significado para los resultados.



	banda « wild type »	banda « mutant »	genotipo
NOR	positivo	negativo	normal
HET	positivo	positivo	heterocigoto
HOM	negativo	positivo	homocigoto mutante

Véanse los ejemplos sobre los resultados del StripAssay de la página III (Fig. 3).

Algunas de las mutaciones puntuales incluidas en el kit CF StripAssay® EXT están localizadas en unos pocos nucleótidos del gen CFTR. En las Teststrips, estas mutaciones están representadas por una sonda « wild type » común, de modo que las 38 mutaciones están cubiertas solamente por 29 sondas « wild type ».

línea	sonda « wild type »	mutación
22	codon 507 to 508	I507del (-ATC), F508del (-CTT)
26	codon 551 to 553	G551D, R553X
29	2183 to 2184	2183AA>G, 2184delA, 2184insA
31	codon 1158 to 1162	R1158X, R1162X
55	codon 85 and 394	G85E, 394delTT
56	codon 92	E92X, E92K
60	codon 334 to 336	R334W, I336K
61	codon 347	R347H, R347P

Las muestras que sean heterocigotas compuestas para dos de estas mutaciones (p.e. I507del + F508del o G551D + R553X) carecerán de la banda « wild type » común (véase el ejemplo G, página III).

En caso de muestras que son homocigóticas para CFTRdel2,3, para codon 60 y para codon 85 y 394 además falta la señal « wild type » (véase el ejemplo F, página III).

Las variantes benignas I506V, I507V y F508C no causan ninguna interferencia en el ensayo y aparecerán como CFTR salvaje en el CF StripAssay®.

Se pueden encontrar consejos sobre los problemas que pueden surgir poniéndose en contacto con ViennaLab a través del distribuidor local o directamente en la dirección facilitada en la página I.

VII. CONSIDERACIONES SOBRE LA CALIDAD

- Para obtener resultados fiables, es preciso entender perfectamente el procedimiento aquí resumido, así como disponer de un equipo y técnicas de laboratorio precisos. El uso del StripAssay para diagnóstico humano in vitro debe estar limitado al personal adecuadamente formado y experimentado.
- No utilizar los componentes del StripAssay pasada la fecha de caducidad impresa en el exterior de la caja. No mezclar reactivos pertenecientes a lotes diferentes.
- Evitar la contaminación microbiana y la contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras utilizando puntas de pipetas estériles y desechables durante todo el proceso. No intercambiar los tapones de los frascos.
- La línea de control de cada Teststrip permite realizar un control del rendimiento del sistema de detección cromógena. Para monitorizar y validar la especificidad de los pasos de hibridación y lavado, se deberían incluir controles de genotipos conocidos cada vez que se realizaran estudios genéticos.

VIII. SEGURIDAD

- No beber, comer, fumar o utilizar productos cosméticos en las áreas de trabajo designadas. Llevar ropa de laboratorio y guantes desechables mientras se manipulan las muestras y los reactivos del kit. Lavarse bien las manos al finalizar.
- Manipular las muestras como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Limpiar y desinfectar a fondo todos los materiales y superficies que hayan entrado en contacto con las muestras. Eliminar todos los residuos asociados a las muestras clínicas en un contenedor para residuos biológicos potencialmente peligrosos.
- Evitar el contacto del DNAT con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con mucha agua. En caso de derrame, diluir con agua antes de secar el área afectada con un trapo.
- Seguir la normativa de seguridad medioambiental local y estatal vigente.

Instruções de utilização

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Ensaio para a identificação de mutações no gene Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) baseado na reacção em cadeia da polimerase (PCR) e hibridação reversa. *Para o diagnóstico humano in vitro.*

II. METHODOLOGY

O procedimento inclui três passos: (1) isolamento do DNA, (2) amplificação por PCR utilizando *primers* biotinilados, (3) hibridação de produtos de amplificação numa tiras de teste com sondas oligonucleotídicas específicas de alelo num *array* de linhas paralelas (Fig. 1). As sequências biotiniladas ligadas são detectadas usando fosfatase alcalina-estreptavidina e substratos de cor.

O ensaio engloba 38 mutações e 1 polimorfismo no gene CFTR: CFTRdel2,3 (21kb), I507del (-ATC), F508del (-CTT), 1677delTA, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, 2043delG, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 2184insA, 2789+5G>A, R1158X, R1162X, 3659delC, 3905insT, W1282X, N1303K [Teststrip A]; E60X, G85E, 394delTT, E92X, E92K, R117H, 621+1G>T, 1078delT, R334W, I336K, R347H, R347P, A455E, 3120+1G>A, 3272-26A>G, Y1092X, M1101K, 3849+10kbC>T, IVS8 5T/7T/9T [Teststrip B].

Masi informação genética está disponível na OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

III. COMPONENTES DO KIT

Ver lista de todos os components do kit na página I.

DNAT contém 1.6% NaOH.

⚠ Atenção

H315: Provoca irritação cutânea

H319: Provoca irritação ocular grave

P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial

P337 + P313: Caso a irritação ocular persista: consulte um médico

Amplification Mix, Taq Dilution Buffer, Conjugate Solution, Wash solution B contém 0.05% NaN₃. Conjugate Solution contém fosfatase alcalina-estreptavidina. Color Developer contém Nitroazul de tetrazólio (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP).

Conserve todos os reagentes a 2-8°C quando não estiverem a ser utilizados !

IV. MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Adicionalmente ao material padrão do laboratório de biologia molecular, é necessário:

- Aparelho de termociclos e tubos adequados de paredes de plástico finas/tiras
- Banho de água com plataforma de agitação e temperatura ajustável (45°C ± 0.5°C)
- Aparelho de aspiração de vácuo
- Agitador (de leito ou orbital)
- *Opcional: equipamento de electroforese em gel de agarose (para controlo dos produtos da amplificação)*

V. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Isolamento do DNA

Utilize sangue fresco ou congelado com EDTA ou anticoagulante citrato; evite sangue com heparina.

Não conserve o sangue durante mais do que 3 dias à temperatura ambiente ou mais do que uma semana a 2-8°C antes de utilizar. O sangue que foi mantido congelado durante mais do que um ano, ou que esteve sujeito a mais do que três ciclos de congelação/descongelação é inapropriado para ser utilizado neste procedimento.

Deixe as amostras estabilizar à temperatura ambiente. Misture bem invertendo cuidadosamente, várias vezes, os tubos de sangue. Repita a mistura cada vez, antes de retirar uma alíquota do sangue.

Deixe que a Lysis Solution e a GEN^XTRACT Resin estabilizem à temperatura ambiente.

- Pipete **100 µl** da **amostra de sangue** para um microtubo de 1.5 ml com tampa de enroscar.
- Adicione **1 ml** da **Lysis Solution**, feche o tubo e misture várias vezes por inversão.
- Deixe estabilizar **15 min.** à temperatura ambiente.
- Centrifugue **5 min.** a **3,000 rpm** (aprox. 1,000 x g) numa microcentrifuga.
- Remova e rejeite a porção de cima (topo) 1 ml de sobrenadante.
- Adicione **1 ml** de **Lysis Solution**, feche o tubo e misture várias vezes por inversão.
- Centrifugue **5 min.** a **12,000 rpm** (aprox. 12,000 x g) numa microcentrifuga.
- Remova e rejeite o sobrenadante excepto aprox. 50 µl de um pellet suave e visível.
- Resuspenda a GEN^XTRACT Resin por rotação insistente do recipiente.
- Adicione **200 µl** da **GEN^XTRACT Resin** ao pellet. Feche o tubo e agite no vortex 10 seg.
⚠ A GEN^XTRACT Resin sedimenta rapidamente. Repita a resuspensão de cada vez e imediatamente antes de remover outra alíquota.
- Incube **20 min.** a **56°C**. Agite no vortex 10 seg.
- Incube **10 min.** a **98°C**. Agite no vortex 10 seg.
- Centrifugue **5 min.** a **12,000 rpm** numa microcentrifuga. Arrefeça no gelo.

O sobrenadante resultante contém um template de DNA adequado para uso imediato em PCR. Para manter conservado, o sobrenadante deve ser transferido para um tubo novo arrefecido e manter a refrigeração (2-8°C; até uma semana) ou congelado a -20°C.

2. Amplificação In Vitro (PCR; 2 reacções separadas por amostra)

Mantenha todos os reagentes de PCR e os templates de DNA sempre refrigerados ao longo do procedimento. Realize todos os passos até ao início do programa de termociclos em gelo (0-4°C).

- Prepare uma diluição de trabalho nova (1:25, conc. final 0.2 U/µl) de **HS Taq DNA Polymerase** (tampa vermelha) no **Taq Dilution Buffer** (tampa transparente).
- Prepare dois tubos de reacção para cada amostra a ser amplificada. Coloque os tubos no gelo.
- Para cada amostra prepare duas misturas de reacção finais de PCR (A e B) no gelo:
15 µl Amplification Mix A (tampa amarela) e **15 µl Amplification Mix B** (tampa verde)
5 µl HS Taq DNA Polymerase diluída (1U) **5 µl HS Taq DNA Polymerase diluída (1U)**
5 µl template de DNA **5 µl template de DNA**

Se os templates de DNA utilizados não foram preparados de acordo com o protocolo do kit de isolamento (capítulo V/1), é recomendada a utilização de um intervalo de concentração de DNA de 2-20 µg/ml (= 10-100 ng DNA por reacção).

- Coloque bem as tampas nos tubos. Pré-aqueça o aparelho de termociclos a 94°C.
- Insira os tubos de reacção e ponha a funcionar o seguinte programa de termociclos:
 - pré-PCR: 94°C/3 min.
 - termociclos: 94°C/15 seg. - 60°C/45 seg. - 72°C/1 min. (35 ciclos)
 - extensão final: 72°C/3 min.

Conserve os produtos de amplificação no gelo ou a 2-8°C para utilização futura.

Opcional: Analise os produtos de amplificação por electroforese em gel de agarose (ex. gel de agarose a 3%).

Comprimentos dos fragmentos: 472, 345, 315, 278, 257, 236/213, 194, 165 bp (produto de amplificação A)
386, 350, 322, 297, 248, 225, 200, 172, 155 (produto de amplificação B)

3. Hibridação - 2 Teststrips por amostra (45°C; banho de água com agitação)

Ajuste o nível de água no banho até aprox. ½ da altura do Typing Tray.

Aqueça banho de água a exactamente 45°C (± 0.5°C). Verifique a temperatura da água com termómetro calibrado

Pré-aqueça o Hybridization Buffer e a Wash Solution A a 45°C. (Tenha atenção, que todos os precipitados formados a 2-8°C sejam completamente dissolvidos.)

Deixe que as Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B e o Color Developer estabilizem à temperatura ambiente. Prepare o Typing Tray(s).

Remova uma Teststrip A e uma Teststrip B para cada amostra usando uma pinça limpa. (Toque nas Teststrips apenas com luvas!). Identifique as Teststrips fora das zonas marcadas com um lápis. (Não utilize esferográficas, marcadores, etc)

*Para todas as **Teststrips A** (uma via por amostra):*

- Pipete **10 µl DNAT** (tampa azul) para o canto inferior de cada pista a ser utilizada nos Typing Trays.
- Adicione **10 µl de produto de amplificação A** à gota correspondente de DNAT. Misture bem com pipeta. (A solução deverá permanecer azul.)

*Para todas as **Teststrips B** (uma via por amostra):*

- Pipete **10 µl DNAT** (tampa azul) para o canto inferior de cada pista a ser utilizada nos Typing Trays.
- Adicione **10 µl de produto de amplificação B** à gota correspondente de DNAT. Misture bem com pipeta. (A solução deverá permanecer azul.)

- Deixe em repouso durante **5 min.** à temperatura ambiente.
- Adicione **1 ml de Hybridization Buffer** (pré-aquecido a 45°C) em cada pista. Agite o tabuleiro (tray) cuidadosamente. (A cor azul vai desaparecer.)
- Insira a **Teststrip A** ou a **Teststrip B** com o lado marcado para cima (linhas visíveis) nas pistas respectivas. Submerja completamente.
- Incube **30 min.** a **45°C** na plataforma de agitação do banho de água. *Programe uma velocidade de agitação moderada (aprox. 50 rpm) para evitar salpicos. Mantenha a tampa do banho fechada para evitar variações de temperatura.*
- No final da incubação remova as soluções de hibridação por aspiração de vácuo. *Continue imediatamente. Não deixe que as Teststrips sequem durante todo o procedimento.*

4. Lavagem de estringência (45°C; banho de água com agitação)

- Adicione **1 ml** de **Wash Solution A** (pré-aquecido a 45°C). Lave ligeiramente (10 seg.). Remova os líquidos por aspiração de vácuo.
- Adicione **1 ml** de **Wash Solution A** (45°C).
- Incube **15 min.** a **45°C** no banho de água com agitação. Remova os líquidos por aspiração de vácuo.
- Adicione **1 ml** de **Wash Solution A** (45°C).
- Incube **15 min.** a **45°C** no banho de água com agitação. Remova os líquidos por aspiração de vácuo.

5. Desenvolvimento de cor (temperatura ambiente)

- Adicione **1 ml** de **Conjugate Solution**.
- Incube **15 min.** à **temperatura ambiente** num leito com agitação ou agitador orbital. Remova os líquidos por aspiração de vácuo.
- Adicione **1 ml** de **Wash Solution B**. Lave ligeiramente (10 seg.). Remova os líquidos por aspiração de vácuo.
- Adicione **1 ml** de **Wash Solution B**.
- Incube **5 min.** à **temperatura ambiente** num leito com agitação ou agitador orbital. Remova os líquidos por aspiração de vácuo.
- Adicione **1 ml** de **Wash Solution B**.
- Incube **5 min.** à **temperatura ambiente** num leito com agitação ou agitador orbital. Remova os líquidos por aspiração de vácuo.
- Adicione **1 ml** de **Color Developer**.
- Incube **15 min.** à **temperatura ambiente** no escuro num leito com agitação ou agitador orbital.
Vai surgir uma coloração púrpura depois da reacção positiva.
- Lave várias vezes as Teststrips com água destilada.
Deixe que as tiras sequem no escuro em papel absorvente.
Não exponha a luz intensa as Teststrips depois do Desenvolvimento de cor.

VI. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

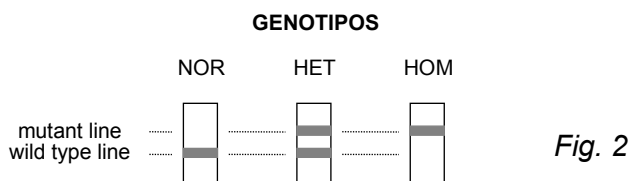
O genótipo da amostra é determinado pela correspondência das Teststrip A e B usando a folha Collector™ inclusa.

Coloque as duas Teststrips processadas dentro dos campos designados, alinhe-as com o desenho esquemático usando a linha marcadora vermelha (topo) e a linha marcadora verde ou azul (fundo) e cole-as com fita adesiva.

Uma reacção positiva da linha de controlo mais acima indica o funcionamento correcto da Conjugate Solution e do Color Developer. Esta linha deve sempre colorir-se de modo positivo.

Para cada posição polimórfica, um dos segunites padrões de coloração deve ser obtido:

Nota: As intensidades de coloração das linhas positivas podem variar. Tal não tem significado para o resultado.



	linha « wild type »	linha « mutant »	genótipo
NOR	positivo	negativo	normal
HET	positivo	positivo	heterozigótico
HOM	negativo	positivo	mutante homozigótico

Ver exemplos do resultados das StripAssay na página III (Fig. 3).

Agumas das mutações pontuais englobadas pelo CF StripAssay® EXT localizam-se em poucos e determinados nucleotidos do gene CFTR. Nas Teststrips estes estão representados por uma sonda « wild type » comum, para que as 38 mutações sejam cobertas apenas por 29 sondas « wild type ».

linha	sonda « wild type »	mutação
22	codon 507 to 508	I507del (-ATC), F508del (-CTT)
26	codon 551 to 553	G551D, R553X
29	2183 to 2184	2183AA>G, 2184delA, 2184insA
31	codon 1158 to 1162	R1158X, R1162X
55	codon 85 and 394	G85E, 394delTT
56	codon 92	E92X, E92K
60	codon 334 to 336	R334W, I336K
61	codon 347	R347H, R347P

As amostras que são compostos heterozigóticos para duas destas mutações (ex. I507del + F508del ou G551D + R553X) não terão o sinal comum de « wild type » (ver exemplo G, página III).

Além do seu sinal de « wild type », as amostras homozigóticas para CFTRdel2,3 não apresentarão o sinal de « wild type » para codon 60 e para codon 85 e 394 (ver exemplo F, página III).

As variantes benignas I506V, I507V e F508C não causam nenhuma interferência no ensaio e aparecerão como CFTR selvagem no CF StripAssay®.

Conselhos para resolução rápida de problemas podem ser obtidos por contacto com a ViennaLab através do distribuidor local ou por contacto directo para o endereço disponibilizado na página I.

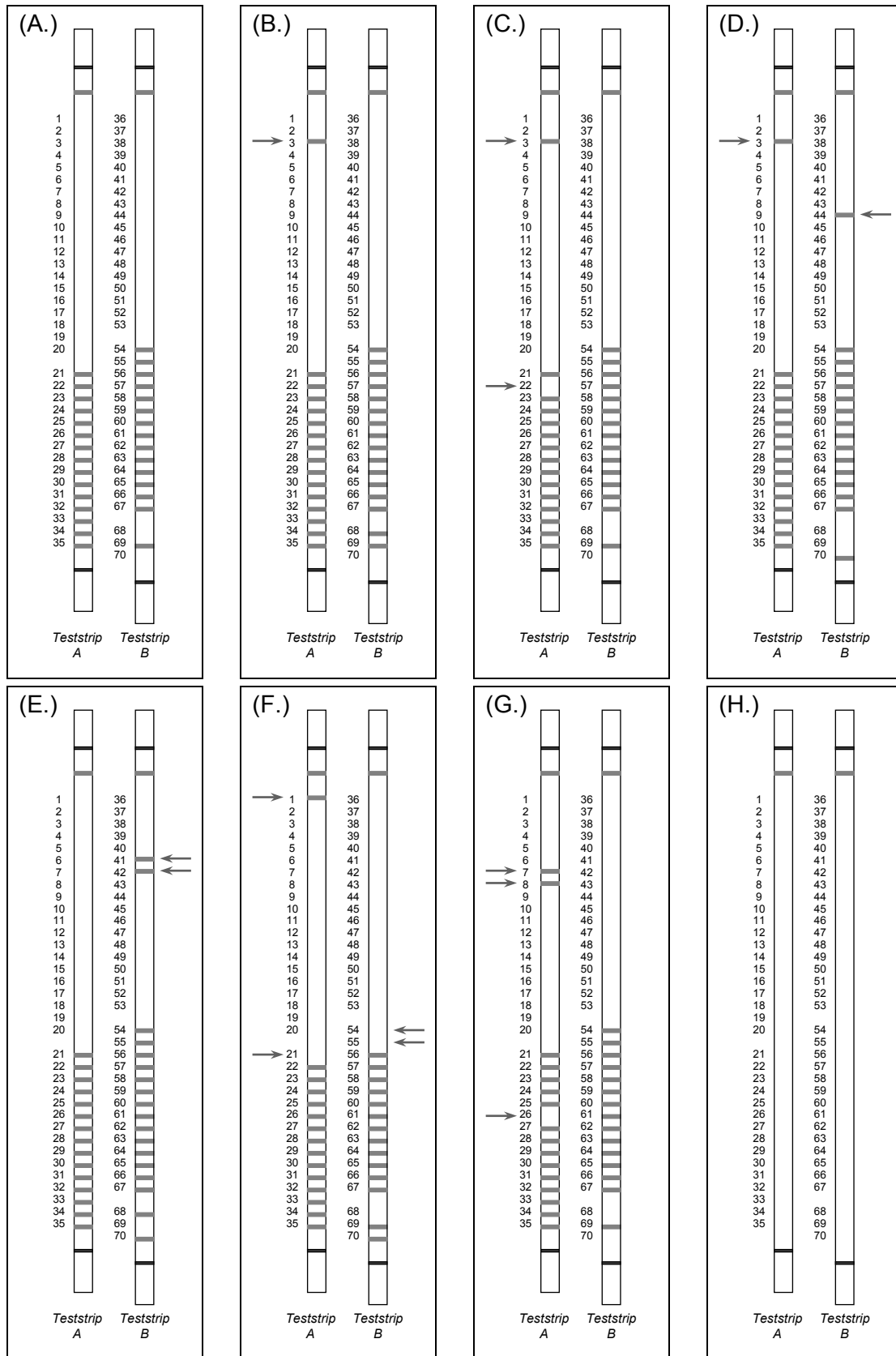
VII. CONSIDERAÇÕES DE QUALIDADE

- O entendimento detalhado do procedimento aqui explicado, e equipamento de laboratório e técnicas precisas, são necessárias para obter resultados fiáveis. Utilização do StripAssay para diagnóstico *in vitro* humano deve ser restrito a pessoal com o treino adequado.
- Não utilize componentes do StripAssay depois do prazo de validade ter expirado. O prazo de validade está impresso na parte exterior da caixa do kit. Não misture reagentes de lotes diferentes.
- Evite a contaminação microbiana e a contaminação cruzada de reagentes ou amostras pela utilização de pontas de pipetas estéreis e descartáveis, ao longo do procedimento. Não troque as tampas dos recipientes.
- A linha Control imobilizada em cada Teststrip permite um controlo do desempenho do sistema de detecção cromogénica. Para monitorizar e validar a especificidade dos passos de hibridação e lavagem, devem ser incluídos DNA's de controlo de um genótipo conhecido, em cada experiência individualizada.

VIII. SEGURANÇA

- Não beba, coma, fume, ou aplique cosméticos na área de trabalho. Utilize batas de laboratório e luvas descartáveis quando manipular as amostras e os reagentes do kit. A seguir, lave as mãos cuidadosamente.
- Manipule as amostras como potencialmente infecciosas. Lave e desinfete cuidadosamente todos os materiais e superfícies que estiveram em contacto com as amostras. Rejeite todos os resíduos associados a amostras clínicas para um contentor de material bioperigoso.
- Evite o contacto do DNAT com a pele, olhos, ou membranas mucosas. Se ocorrer contacto, Lave imediatamente com abundante quantidade de água. Se houver salpicos, dilua com água antes de secar.
- Adira a todos os regulamentos locais e federais de segurança e ambientais que possam ser aplicáveis.

Fig. 3: Examples of test results



(A.) normal [7T/7T]

(B.) F508del heterozygous [5T/7T]

(C.) F508del homozygous [7T/7T]

(D.) F508del/R334W compound heterozygous [9T/9T]

(E.) R117H/621+1G>T compound heterozygous [5T/9T]

(F.) CFTRdel2,3 (21kb) homozygous [7T/9T]

(G.) G551D/R553X compound heterozygous [7T/7T]

(H.) negative control or PCR failure

REF



4-410	CF StripAssay®	10 tests
4-420	CF StripAssay® TUR	10 tests
4-430	CF StripAssay® GER	10 tests
4-440	CF StripAssay® EXT	10 tests
2-014	GEN ^X TRACT Blood DNA Extraction System	100 extractions
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 extractions

Distributed by:



Manufacturer:

ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (+43-1) 8120156-0
Fax: (+43-1) 8120156-19
info@viennalab.com



ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

www.viennalab.com