



IFU-MPK01-ES
Version 10
Última revisión: 2022/05

MucoPAP

Kit de ensayo de PAP para la detección neonatal de fibrosis quística

Patente INSERM

Ensayo inmunoenzimático

Instrucciones para su uso y reactivos para 96 medidas

Fabricado por:

DYNABIO S.A.,

Luminy Biotech Entreprises

Case 922 – 163, avenue de Luminy

13288 Marseille cedex 09

France

Tel : 04 86 94 85 04

www.dynabio.com

REF MPK01

IVD

CE

SÍMBOLOS



Para uso diagnóstico *in vitro*



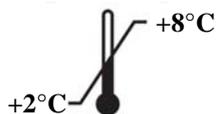
Número de lote



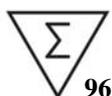
Número de catalogo



Fecha de caducidad (aaaa/mm/dd)



Mantener entre +2°C y +8°C



Contiene reactivos para 96 medidas



Nota: leer el manual del usuario



Fabricante

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
PRINCIPIO DE LA MEDICION	4
EQUIPOS Y PRODUCTOS NO SUMINISTRADOS PARA LA MEDICION	4
COMPOSICIÓN DEL KIT	5
DESCRIPCIÓN DE LOS REACTIVOS	6
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y SU PROCESAMIENTO	6
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	6
RECOMMANDACIONES PARA EL USO	7
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	7
PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	7
REALIZACIÓN DE LA MEDICION	8
CALCULO DE LOS RESULTADOS	9
Calibración	9
Control de calidad	10
Análisis de los resultados de las muestras de los recién nacidos	10
LIMITACIONES DE LA MEDICION	10
INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS	11
RENDIMIENTO	11
CARACTERISTICAS ANALITICAS	11
GARANTIA	13
REFERENCIAS	13
RESUMEN DEL ENSAYO	13

INTRODUCCIÓN

La Proteína Asociada a la Pancreatitis (PAP, también conocida como Reg3A) es sintetizada por el páncreas en respuesta al sufrimiento pancreático. En los casos de fibrosis quística, el páncreas ya se encuentra afectado en el útero y en respuesta a ello produce PAP. Varios estudios han demostrado que la concentración de PAP es alta en la sangre de los recién nacidos enfermos (1, 2, 3, 4, 5).

La determinación de PAP sobre cartones de pesquisa calibrados permite identificar a los recién nacidos susceptibles de tener fibrosis quística.

PRINCIPIO DE LA MEDICION

El kit MucoPAP está destinado a a determinar la cantidad de PAP en las muestras de sangre de recién nacidos depositadas en los cartones de pesquisa calibrados y aprobados por las autoridades competentes. Este es un inmunoensayo de tipo sándwich que usa la técnica de revelación enzimática (ELISA). El rango de referencia del ensayo así como el control interno se presentan en forma liofilizada, se toman en agua destilada y se diluyen para obtener las concentraciones de PAP determinadas en este manual.

Los pocillos de la placa de microtitulación están recubiertos con anticuerpos anti-PAP. El rango, el control y los eluidos de las manchas de sangre se depositan en los pocillos y la PAP contenida se une a los anticuerpos específicos. Las proteínas que no son fijadas se lavan. Los anticuerpos anti-PAP secundarios marcados con biotina se depositan entonces en los pocillos y se unen a la PAP inmovilizada. Luego del lavado, el complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante el complejo avidina-peroxidasa. Después de una nueva etapa de lavado, la adición de un sustrato cromogénico de la enzima peroxidasa provoca la aparición de un producto de color azul. Detener la reacción enzimática mediante la adición de ácido convierte el color azul en amarillo, medible por espectrofotometría a 450 nm. La intensidad de la coloración emitida es proporcional a la cantidad de PAP contenida en el eluido de partida.

EQUIPOS Y PRODUCTOS NO SUMINISTRADOS PARA LA MEDICION

Material :

- Agitador Vortex
- Lavador de placas (automático o semiautomático)
- Espectrofotómetro para microplacas, equipado con un filtro de 450 nm (y opcionalmente un filtro de 630 nm para restar la intensidad residual del color azul a la densidad óptica medida a 450 nm)
- Ordenador acoplado al espectrofluorímetro para el análisis de los resultados
- Micropipetas automáticas mono- y multicanales
- Botella de un litro (tampón de lavado)
- Sacabocados manual o automático para cortar los discos de papel filtro de un diámetro de 3 mm
- Dos litros de agua destilada

Material descartable:

- Placa de 96 pocillos con fondo redondo (para la elución de las manchas de sangre)
- Puntas para micropipetas
- Pipetas de plástico de 10 mL
- Cinco frascos identificados para los reactivos descartables (uno por reactivo): PBS, anticuerpos biotinilados, avidina-peroxidasa, sustrato cromogénico y ácido
- Manchas de sangre de los recién nacidos sobre cartones de pesquisa calibrados y aprobados por las autoridades competentes

COMPOSICIÓN DEL KIT

Cada kit contiene reactivos para 96 medidas. La fecha de caducidad está indicada en todas las etiquetas del kit.

La presentación de la placa de microtitulación, en forma de barras desmontables, permite adaptar la medida al número de muestras a analizar. Sin embargo, cada medida debe incluir una curva de referencia y el control interno.

REACTIVOS	CONSERVACION ANTES DE LA APERTURA	CARACTERISTICAS DE UTILISACION	CONSERVACION DESPUES DE LA APERTURA
Placa de microtitulación (96 pocillos en barras horizontales de 8 x 12 pocillos)	Conservar al abrigo de la luz en el embalaje original entre +2°C y +8°C hasta la fecha de caducidad.	Recubierta de anticuerpos anti-PAP. Lista para la utilización.	Conservar entre +2°C y +8°C en bolsita con desecante durante 30 días como máximo
Rango de referencia de PAP	Estable entre +2°C y +8°C hasta la fecha de caducidad.	Liofilizado que debe tomarse suavemente en 1 mL de agua destilada, directamente en el tubo.	Conservar a -20°C durante 30 días como máximo.
Control interno		Liofilizado que debe tomarse suavemente en 11 mL de agua destilada, directamente en el frasco.	
Tampón de dilución del rango de PAP de referencia			
Anticuerpos anti-PAP biotinilados			
Conjugado avidina-peroxidasa		Frasco de 15 mL. Listo para su utilización.	Conservar entre +2°C y +8°C durante 30 días como máximo.
Sustrato cromogénico (TMB)		Frasco de 11 mL. Listo para su utilización	
Acido (H ₂ SO ₄)		Disolver en 1 L de agua destilada. Reservar 15 mL para la elución de las manchas de sangre.	Conservar a -20°C el tampón de lavado preparado durante 30 días como máximo.
Pastilla de PBS		Añadir a los 985 mL restantes de PBS para obtener el tampón de lavado.	
Solución de Tween 20			

En estas condiciones, el kit puede utilizarse dentro de los 30 días siguientes a su apertura.

Tal como lo suministra Dynabio, el kit de ensayo MucoPAP no está automatizado.

DESCRIPCIÓN DE LOS REACTIVOS

REACTIVOS	DESCRIPCIÓN	CONCENTRACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO
Placa de microtitulación (96 pocillos en barras horizontales de 8 x 12 pocillos)	Pocillos recubiertos con anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos específicamente contra PAP	4 µg/mL
Rango de referencia	Proteína humana recombinante PAP (rhPAP) en tampón fosfato que contiene proteínas bovinas y agentes protectores	0,5 µg/L de PAP
Control interno	Proteína humana recombinante PAP (rhPAP) en tampón fosfato que contiene proteínas bovinas y agentes protectores	0,02 µg/L de PAP
Anticuerpos anti-PAP biotinilados	Anticuerpos monoclonales de ratón específicos de PAP, acoplado a la biotina, en tampón de fosfato conteniendo agentes protectores	0,25 µg/mL
Tampón de dilución del rango de referencia	Solución salina a base de Tris-HCl conteniendo proteínas bovinas y agentes protectores	/
Conjugado avidina-peroxidasa	Avidina acoplada a la enzima peroxidasa, en tampón fosfato/citrato conteniendo agentes protectores	0,16 µg/mL
Sustrato cromogénico (TMB)	Solución de sustrato cromogénico de la enzima peroxidasa 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB)	≤ 0.05%
Acido (H ₂ SO ₄)	Solución de ácido sulfúrico diluido	5,4%
Pastilla de PBS	Tampón de fosfato salino	/
Solución de Tween 20	Solución concentrada de detergente	10%

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y SU PROCESAMIENTO

Las muestras de sangre se deben tomar por punción del talón y se recogen directamente sobre el papel de filtro aprobado (método de referencia).

El método y dispositivo de muestreo completo debe cumplir totalmente con las regulaciones.

Se recomienda consultar las reglamentaciones respecto del tipo de muestra requerida y del período apropiado de recogida de las muestras de acuerdo con el actual programa de pesquisa neonatal. En este programa también están definidos los plazos en los que la PAP sea medida luego que la muestra ha sido recogida.

La calidad de los resultados de una determinación basada en muestras de sangre secas depende directamente del cuidado que se ha tomado en la recolección, la manipulación, la transferencia y la conservación de las muestras. La documentación (6) describe con precisión los métodos de recolección de muestras y las técnicas aceptables para aplicar las gotas o las alícuotas de sangre sobre el papel de filtro estandarizado. También proporciona las instrucciones sobre el manejo, el transporte y la conservación adecuado de las muestras para asegurarse de la calidad de los resultados en la pesquisa neonatal.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este kit sólo debe utilizarse para el diagnóstico *in vitro* y solo por personal capacitado y con los equipos de protección adecuados.

Las manchas de sangre secas de los pacientes así como los anticuerpos biotinilados contienen elementos sanguíneos de origen humano o animal: deben considerarse potencialmente infecciosos y deben ser manipulados tomando las precauciones necesarias para proteger al usuario.

Consulte la Ficha de Datos de Seguridad del dispositivo para su eliminación. Los residuos deben eliminarse de acuerdo con la normativa vigente en el país de utilización.

No se debe pipetear con la boca.

No coma, ni beba, ni fume durante la manipulación.

Los siguientes reactivos pueden ser tóxicos o irritantes: PBS, sustrato cromogénico (TMB) y solución de ácido (H_2SO_4). Evite el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas. En caso de contacto accidental, enjuagar con abundante agua.

Cualquier incidencia grave que se produzca en relación con el producto deberá ser comunicada al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

RECOMMANDACIONES PARA EL USO

Establecer un diagrama de la placa definiendo el orden de depósito en los pozos de los puntos de rango, blanco, controles y muestras de recién nacidos, y seguirlo escrupulosamente para evitar la inversión.

Evite la contaminación biológica o química de las muestras.

No utilice reactivos obsoletos.

No mezcle reactivos de diferentes lotes.

Equilibre todos los reactivos a temperatura ambiente ($+19^{\circ}C$ a $+22^{\circ}C$) y agítelos antes de usarlos.

Evite la contaminación cruzada entre los diferentes reactivos: use un depósito diferente para cada reactivo (los depósitos no son suministrados).

Respete estrictamente el tiempo de incubación indicado para cada paso.

Los lavados se deben realizar cuidadosamente para evitar un aumento del ruido de fondo.

Nunca permita que la placa se seque porque se vería perjudicada la calidad de los resultados.

Los reactivos liofilizados (rango de referencia, control interno, anticuerpos biotinizados, avidina-peroxidasa) deben prepararse con al menos 10 minutos de anticipación para que su disolución sea completa y los reactivos homogéneos.

El sustrato TMB no debe exponerse ni al aire ni a la luz antes de su utilización.

En caso de daños en el equipo durante el transporte (botellas invertidas y/o rotas, bolsas de aluminio re-infladas), póngase en contacto con Dynabio S.A. por correo electrónico a info@dynabio.com o por teléfono llame al +33 (0) 4 86 94 85 04.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El día antes de la cuantificación:

Disolver la tableta de PBS suministrada en 1 L de agua destilada. Luego de la homogeneización completa, utilizar 15 mL para la elución de las manchas de sangre: los restantes 985 mL se mantienen entre $+ 2^{\circ}C$ y $+ 8^{\circ}C$ hasta el día siguiente para preparar el tampón de lavado

Muestras a analizar: Cortar en los cartones una pastilla de 3 mm de diámetro, imperativamente en la periferia de la mancha de sangre, en un área donde la sangre impregnó completamente el cartón, sin sobrecarga ni doble deposición. Colocar la pastilla en uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo redondo (no incluida en el kit). Para obtener una dosis doble, puncionar en 2 lugares separados en la misma mancha de sangre. Añadir 150 μL de tampón PBS a cada pocillo. Eluir al menos durante 16h (una noche) a una temperatura entre $+ 2^{\circ}C$ y $+ 8^{\circ}C$.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

El día de la cuantificación: Después de esta incubación durante la noche, todos los eluidos debe ser homogeneizada por succión y descarga antes de tomarse la muestra de 100 μL que debe ser analizada. Los puntales de las micropipetas deberán cambiarse obligatoriamente entre cada homogeneización de eluido de muestras, de puntos de gama o de controles.

Placa de dosificación: la placa, bajo vacío, debe equilibrarse a temperatura ambiente antes de extraerla de su embalaje de aluminio. Después de abrir, el usuario debe identificar la placa para no confundirla con otra placa tratada el mismo día. También se deben identificar todas las barras de cada placa (de A a H) para evitar intercambiarlas en caso de que se desprendan de su marco durante los pasos de lavado.

Tampón de lavado (PBS-0,1% Tween): Añadir al resto del PBS disuelto el día anterior (985 mL) el contenido del frasco de Tween 20 (10%) provisto en el kit y homogeneizar la mezcla.

Rango de referencia estándar: el rango se prepara a partir de PAP recombinante humana liofilizada. El liofilizado se recoge en 1 mL de agua destilada para obtener 0,5 $\mu\text{g/L}$ de PAP. Esta solución estándar a 0,5 $\mu\text{g/L}$ de PAP se usa luego para preparar un rango de referencia que varía de 0,125 a 0,0078 $\mu\text{g/L}$, mediante diluciones sucesivas en el tampón de dilución proporcionado para este propósito.

Control interno: El control también se prepara a partir de PAP humana recombinante liofilizada. El liofilizado se toma en 1 mL de agua destilada para obtener 0,02 $\mu\text{g/L}$ de PAP. Al calcular los resultados, se espera que este control tenga una concentración de $0,02 \times 50 = 1 \mu\text{g/L}$. De hecho, se aplica un factor de elución ($\times 50$) a muestras neonatales debido a la elución de PAP en PBS (3 μL de sangre en el punzón diluido en 150 μL de PBS final). Para simplificar el procesamiento de datos por el software de análisis, este mismo factor debe aplicarse al control interno.

Tampón de dilución del rango de referencia: El liofilizado se toma suavemente en 11 mL de agua destilada, directamente en el frasco. Se usa después de la disolución completa y la homogeneización para preparar diluciones del rango estándar.

Anticuerpos biotinilados: El liofilizado se disuelve delicadamente en 11 mL de agua destilada, directamente en el frasco. Estará listo para su empleo luego de su disolución total y homogeneización.

Avidina-peroxidasa: El liofilizado debe retomarse delicadamente en 11 mL de agua destilada, directamente en el frasco. Estará listo para su empleo luego de su disolución total y homogeneización.

Sustrato cromogénico (TMB): Solución líquida lista para su utilización.

Acido H_2SO_4 : Solución líquida lista para su utilización.

REALIZACIÓN DE LA MEDICION

Se prepara una gama de PAP de referencia a partir de la solución estándar de PAP liofilizada, previamente reconstituida a 0,5 $\mu\text{g/L}$ en 1 mL de agua destilada. El tampón de dilución proporcionado en el kit se usa para preparar diluciones sucesivas de esta solución estándar y obtener las siguientes concentraciones de PAP: 0,125 / 0,062 / 0,031 / 0,015 / 0,0078 $\mu\text{g/L}$. Cada dilución de 0,125 a 0,0078 $\mu\text{g/L}$ se dosificará por duplicado a razón de 100 $\mu\text{L/pocillo}$.

Preparación del rango de referencia (ejemplo para un rango de PAP depositado por duplicado):

150 μL de la solución estándar a 0,5 $\mu\text{g/L}$ + 450 μL de tampón de dilución = 0,125 $\mu\text{g/L}$

después:

300 μL de la dilución a 0,125 $\mu\text{g/L}$ + 300 μL de tampón de dilución = 0,062 $\mu\text{g/L}$

después:

300 μL de la dilución a 0,062 $\mu\text{g/L}$ + 300 μL de tampón de dilución = 0,031 $\mu\text{g/L}$

después:

300 μL de la dilución a 0,031 $\mu\text{g/L}$ + 300 μL de tampón de dilución = 0,015 $\mu\text{g/L}$

después:

300 μL de la dilución a 0,015 $\mu\text{g/L}$ + 300 μL de tampón de dilución = 0,0078 $\mu\text{g/L}$

El ruido de fondo (blanco correspondiente a 0 $\mu\text{g/L}$ de PAP) se determinará mediante la deposición de 100 $\mu\text{L/pocillo}$ de tampón de dilución. Las puntas de las micropipetas deben cambiarse entre cada dilución del rango PAP estándar.

El rango, el blanco, el control interno y las muestras a analizar se depositan en los pocillos (100 $\mu\text{L/pocillo}$). Los puntales de las micropipetas deberán cambiarse obligatoriamente entre cada homogeneización de eluido de muestras o de controles. La placa se cubre con un adhesivo y luego se incuba durante 3 horas a temperatura ambiente (+19°C a +22°C).

Los pocillos se lavan 5 veces de la siguiente manera, usando el tampón de lavado PBS/Tween previamente preparado:

- aspirar el contenido de la placa,
- llene cada pocillo con ~300 μL de tampón PBS/Tween
- repite estos dos pasos 4 veces,
- después del último lavado, elimine el líquido residual invirtiendo vigorosamente la placa (en un fregadero o contenedor de desechos líquidos) y luego golpee sobre toallas de papel.

NB: se recomienda el uso de un lavador automático o semiautomático.

La solución del anticuerpo biotinilado se deposita inmediatamente (100 μL /pocillo) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente la placa cubierta con un adhesivo.

La placa se lava 5 veces como se ha descrito anteriormente.

El conjugado avidina-peroxidasa es inmediatamente añadido (100 μL /pocillo) y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente; la placa se cubre con un adhesivo.

La placa se lava 5 veces como se ha descrito anteriormente.

El sustrato cromogénico (TMB) es luego agregado (100 μL /pocillo) e incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, la placa cubierta con un adhesivo.

A continuación de esta incubación de 15 minutos, una coloración azul de intensidad variable aparece en los pocillos: sin efectuar ningún lavado, agregar directamente 100 μL /pocillo de la solución de ácido para parar la reacción enzimática. Esta adición lleva a un volumen total de 200 μL /pocillo y transforma la coloración azul en amarilla.

La absorbancia de cada pocillo debe ser leída dentro de los 30 minutos que le sigue a la parada de la reacción por el ácido, en un espectrofotómetro equipado de un filtro de 450 nm.

NB: Algunos espectrofotómetros están programados para leer por primera vez a 450 nm y luego por segunda vez con un filtro de referencia a 630 nm. La absorbancia a 630 nm se resta de la de 450 nm para eliminar la intensidad residual del color azul. Sin embargo, el filtro a 630 nm no es esencial.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Calibración

Se debe asignar una curva estándar a cada ensayo. Si el análisis del día incluye varias placas, el rango debe colocarse en cada placa.

Para obtener esta curva, primero debe calcularse el ruido de fondo del ensayo, que corresponde al promedio de los valores obtenidos para el blanco (punto a 0 $\mu\text{g/L}$) y luego restarlo a los resultados brutos obtenidos para todos los puntos de gama.

Este ruido de fondo también se debe restar de la señal de cada réplica de control y muestra antes de calcular el promedio de las dos repeticiones.

Ejemplo de resultados obtenidos para un rango de referencia con una media de ruido de fondo promedio de una densidad óptica de 0,075 (dado como una indicación):

PAP (µg/L)	Absorbancia (Densidad Óptica a 450 nm)				
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1 - promedio del ruido de fondo	Réplica 2 - promedio del ruido de fondo	Promedio
0	0,076	0,074			
0,0078	0,318	0,300	0,243	0,225	0,234
0,015	0,506	0,503	0,431	0,428	0,429
0,031	0,908	0,859	0,833	0,784	0,809
0,062	1,630	1,562	1,555	1,487	1,521
0,125	2,981	2,920	2,906	2,845	2,875

La curva estándar se construye utilizando la función [PAP] = f(absorbancia media), igualando la absorbancia promedio de cada punto de rango con su concentración teórica y aplicando un ajuste de tipo logístico de 4 parámetros. Se recomienda el uso de un programa de computadora para calcular esta función a partir de los valores del rango de referencia. La concentración de PAP en el control y en los eluidos de muestras se calcula usando la ecuación de la curva así construida.

Atención: Los valores obtenidos en el ensayo mediante esta ecuación se deben multiplicar por un factor de 50 para obtener los niveles sanguíneos de PAP en recién nacidos. De hecho, un disco de papel estándar de 3 mm de diámetro contiene 3 µL de sangre. Este disco luego se eluye en 150 µL de PBS, que corresponde a una dilución 1/50. Para volver a la concentración sanguínea de PAP, el valor medido en el eluido de la mancha debe multiplicarse por este factor.

Control de calidad

Se recomienda el uso del control interno para garantizar la validez de los resultados. El control debe tratarse de la misma manera que las muestras, es decir que su valor teórico en el ensayo es 0,02 µg/L pero debe, como las muestras, multiplicarse por 50: así se espera a 1 µg/L. Este control debe incluirse en cada ensayo, como el rango de referencia: si el análisis del día incluye varias placas, el control debe colocarse en cada placa.

Se recomienda que el control no se desvíe de una desviación de +/-20% de su concentración teórica:

Control – Concentración teórica	Limite bajo	Limite alto
Control interno - 1 µg/L	0,8 µg/L	1,2 µg/L

Los resultados de las muestras solo deben validarse si el resultado del control en el ensayo cumple el criterio de aceptabilidad.

En el caso de un problema recurrente o una alteración del rendimiento del ensayo, comuníquese con Dynabio S.A. por correo electrónico a info@dynabio.com o por teléfono llame al +33 (0) 4 86 94 85 04.

Análisis de los resultados de las muestras de los recién nacidos

Cálculo de la concentración de PAP en la sangre de los recién nacidos: si se sigue estrictamente el protocolo descrito anteriormente y si las muestras provienen de cartones de cribado calibrados con un diámetro de 3 mm, la concentración de PAP en sangre para cada recién nacido se obtiene directamente usando la ecuación de la curva de rango [PAP] = f(absorbancia media) y luego multiplicando este resultado por un factor de 50 como se explicó anteriormente.

LIMITACIONES DE LA MEDICION

La información obtenida con el ensayo de PAP utilizando el kit MucoPAP debe utilizarse como complemento de otros ensayos y análisis realizados en el contexto de la pesquisa de la fibrosis quística (ejemplo: la medición IRT). Debe interpretarse de acuerdo con otra información clínica disponible.

Condiciones que pueden inducir resultados analíticos anormales:

- el cartón de cribado no está saturado de sangre uniformemente
- la muestra se ha cortado demasiado cerca del borde del área de muestreo
- la muestra se ha cortado en el centro de la mancha en lugar de su periferia
- la muestra estaba mal recogida o mal secada
- la muestra ha sido expuesta al calor o a la humedad

- el cartón está contaminado con materia fecal
- Véase también “Advertencias y Precauciones” y “Recomendaciones de uso”.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La evaluación de la concentración de PAP en las manchas de sangre se utiliza para identificar una población de recién nacidos con alto riesgo de fibrosis quística. Las estrategias actuales se implementan generalmente en tres etapas. En la primera, el tripsinógeno inmunoreactivo (TIR) se analiza en todos los recién nacidos. En la segunda, la PAP se mide en los recién nacidos con alto valor para TIR. En los recién nacidos con TIR y PAP altos, la tercera etapa consiste en una prueba de diagnóstico, la prueba del sudor, o por la búsqueda de mutaciones en el gen CFTR, posiblemente seguido de una prueba de sudor en recién nacidos portadores de esta mutación.

Una revisión exhaustiva de la ejecución de las estrategias que se utilizan actualmente se llevó a cabo por la Alta Autoridad de la Salud y publicado en 2015. Ella está disponible en el apartado “*Lugar de la estrategia de acoplamiento de la medida de TIR y PAP en la pesquisa sistemática de fibrosis quística en Francia*” en la siguiente dirección:

http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1739994/fr/

Se recomienda hacer referencia a este análisis antes de realizar la pesquisa neonatal de la fibrosis quística con PAP.

RENDIMIENTO

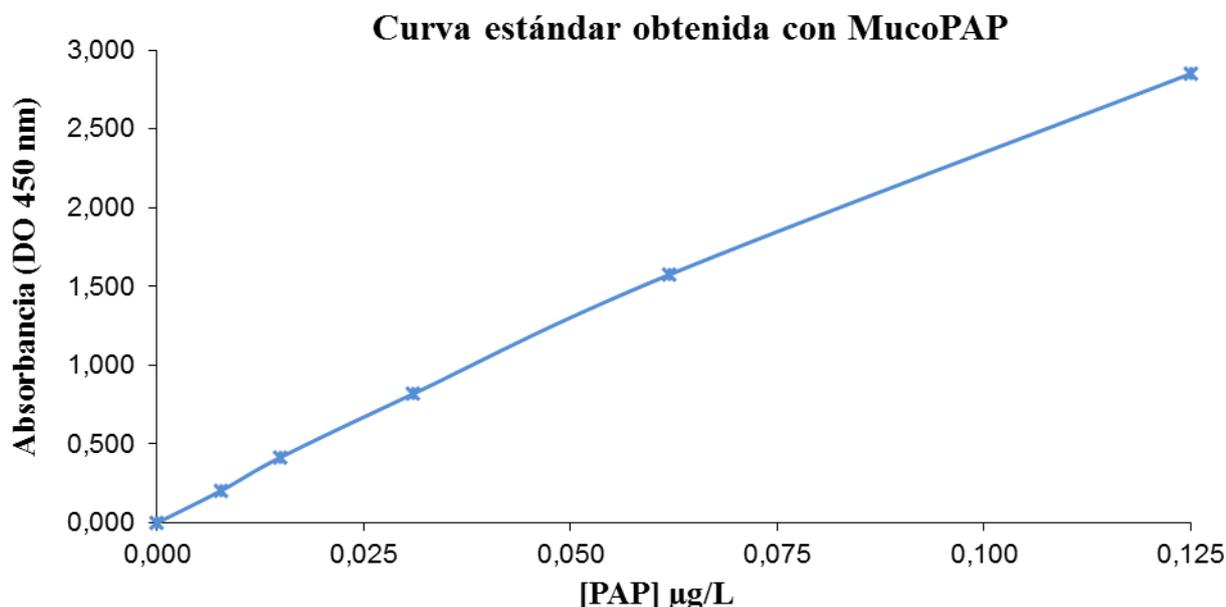
En los recién nacidos con TIR alta ($> 50 \mu\text{g} / \text{L}$), todos los niños con fibrosis quística tienen $\text{PAP} > 1,1 \mu\text{g} / \text{L}$, (con excepción de las formas frustradas y los bebés con íleo meconial). Los neonatos afectados representan aproximadamente el 25% de los neonatos con TIR alto y $\text{PAP} > 1,1 \mu\text{g} / \text{L}$. Entre los recién nacidos de este grupo están los bebés prematuros, los bebés con síndrome de Down y los bebés con infecciones graves del sistema digestivo (4).

CARACTERISTICAS ANALITICAS

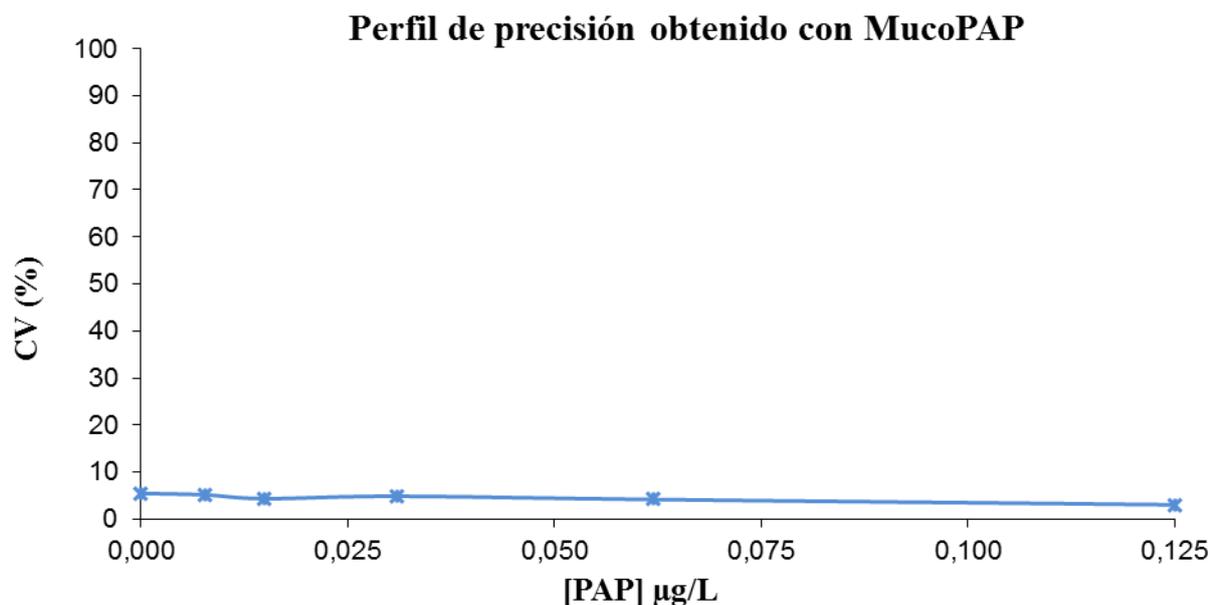
Todos los datos que se presentan a continuación fueron obtenidos con el dispositivo Multiskan FC de Thermofisher Scientific, cuyas características son:

- Agitación de la placa antes de la lectura: 5 segundos,
- Tipo de agitación de placa: continua,
- Velocidad media,
- Fotometría 1: densidad óptica a 450 nm,
- Modo de medición: rápido,
- Fotometría 2: densidad óptica a 620 nm,
- Modo de medición: rápido,
- Diferencia (1-2): densidad óptica a 450 nm - densidad óptica a 620 nm

Curva estándar: En lo gráfico a continuación se muestra una curva estándar típico del dispositivo MucoPAP. Se determinará por duplicado para cada punto de rango en cinco lotes diferentes, sea en diez repeticiones.



Perfil de precisión: El perfil de precisión del dispositivo MucoPAP se determinará por duplicado para cada punto de rango en cinco lotes de kits diferentes, sea en diez repeticiones. En lo gráfico a continuación se muestra este perfil.



Repetibilidad y reproducibilidad: La repetibilidad representa la variación dentro del lote y la reproducibilidad representa la variación entre lotes.

La repetibilidad y la reproducibilidad del dispositivo MucoPAP se determinaron mediante el ensayo de tres muestras de control en cinco lotes diferentes. Los controles utilizados para esta determinación son:

- el control interno proporcionado en el kit, esperado a $0,02 \times 50 = 1 \mu\text{g/L}$, evaluado en cuatro réplicas en cada lote;
- un control externo esperado a $0,04 \times 50 = 2 \mu\text{g/L}$, dosificado en diez réplicas en cada lote;
- otro control externo esperado a $0,10 \times 50 = 5 \mu\text{g/L}$, dosificado en diez réplicas en cada lote.

Los resultados obtenidos con respecto a la repetibilidad y la reproducibilidad se presentan en la tabla a continuación:

Valor esperado del control ($\mu\text{g/L}$)	Valor obtenido ($\mu\text{g/L}$)	Repetibilidad (CV en %)	Reproducibilidad (CV en %)
1	1,046	4,4	5,2
2	1,990	4,0	4,8
5	4,877	4,9	7,2

Límites de detección y cuantificación: Los límites de detección y cuantificación del análisis de MucoPAP (expresados en microgramos de PAP por litro de sangre) son, respectivamente, $0,13 \mu\text{g/L}$ y $0,24 \mu\text{g/L}$, teniendo en cuenta que:

- el límite de detección se define como 3 desviaciones estándar por encima de la media de las mediciones del estándar cero
- el límite de cuantificación se define como 10 desviaciones estándar por encima de la media de las mediciones del estándar cero.

Reactividad cruzada: No se observó reactividad cruzada en el ensayo MucoPAP con las proteínas IL2, IL6, IFN γ , TNF α y las proteínas de *Escherichia coli*.

Efecto gancho: Ausencia de efecto de gancho hasta una concentración de PAP de $1000 \mu\text{g/L}$, expresada en microgramos de PAP por litro de sangre.

GARANTIA

Los cambios o modificaciones del procedimiento recomendado por el fabricante pueden afectar los resultados. En este caso, Dynabio S.A. renuncia a toda responsabilidad, implícita o establecida por la ley, incluyendo la responsabilidad implícita por la venta o el transporte para su uso. En este caso, Dynabio S.A. no se hace responsable de los daños directos o indirectos que de ello resulten.

REFERENCIAS

1. Iovanna *et al.* C R Acad Sci III. 1994;7:561-4.
2. Sarles *et al.* Arch Dis Child 1999;80:F118-22.
3. Barthelémy *et al.* Arch. Pédiatr 2001;8:275-281.
4. Sarles *et al.* J Pediatr 2005;147:302-305.
5. Sarles *et al.* J Cyst Fibros 2014;13:384-90.
6. Dried Blood Spot Specimen Collection for Newborn Screening - Approved Standards (reference NBS01-Ed7, 7^{ème} édition, 2021). Clinical and Laboratory Standards Institute.

RESUMEN DEL ENSAYO

No se olvide de preparar las eluciones de las manchas de sangre con PBS (150 µL/pocillo) el día anterior de la medición en una placa con pocillos de fondo redondo (no incluida en el kit)

1. Coloque las placas de microtitulación y de elución a temperatura ambiente.
2. Preparar el tampón de dilución, el rango y el control.
3. Después de equilibrar a temperatura ambiente, y todas las diluciones están preparadas, retirar la placa de microtitulación de su estuche y, después de la homogeneización, depositar el rango, el blanco, el control y las eluciones de las muestras de sangre (100 µL/pocillo, en doble).
4. Incubar durante 3 horas a temperatura ambiente.
5. Finalizar la preparación del tampón de lavado (añadiendo Tween en el PBS preparado el día anterior).
6. Al final de la incubación de 3 horas, llevar a cabo 5 lavados con PBS/Tween, vaciar la placa, secar.
7. Distribuir el anticuerpo biotinilado (100 µL/pocillo).
8. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Realizar 5 lavados con PBS/Tween, vaciar la placa y secar.
10. Distribuir el conjugado avidina-peroxidasa (100 µL/pocillo).
11. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
12. Realizar 5 lavados con PBS/Tween, vaciar la placa y secar.
13. Distribuir el sustrato cromogénico TMB (100 µL/pocillo).
14. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
15. Sin ningún lavado, parar la reacción añadiendo ácido H₂SO₄ (100 µL/pocillo).
16. Leer la absorbancia a 450 nm.

NOTAS