



*IFU-MPK02-ES*  
*Versión 10*  
*Última revisión: 2022/08*

## **MucoPAPII**

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

**Patente INSERM**

### **Ensayo inmunoenzimático**

Instrucciones de 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.eu](http://www.dynabio.eu)**

**REF** MPK02

**IVD**

**CE**

## SÍMBOLOS



Para uso diagnóstico *in vitro*



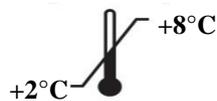
Número de lote



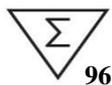
Número de catalogo



Fecha de caducidad (aaaa/mm/dd)



Mantener entre +2°C y +8°C



Contiene reactivos para 96 medidas



Nota: leer el manual de usuario



Fabricante

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>PRINCIPIO DE LA MEDICION.....</b>	<b>4</b>
<b>EQUIPOS Y PRODUCTOS NO SUMINISTRADOS PARA LA MEDICION .....</b>	<b>4</b>
<b>COMPOSICIÓN DEL KIT .....</b>	<b>5</b>
<b>DESCRIPCIÓN DE LOS REACTIVOS .....</b>	<b>6</b>
<b>OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y SU PROCESAMIENTO .....</b>	<b>6</b>
<b>ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....</b>	<b>7</b>
<b>RECOMENDACIONES PARA EL USO .....</b>	<b>7</b>
<b>PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y LOS ESTÁNDARES .....</b>	<b>7</b>
<b>PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....</b>	<b>8</b>
<b>REALIZACIÓN DE LA MEDICION.....</b>	<b>8</b>
<b>CÁLCULO DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>9</b>
<b>Calibración .....</b>	<b>9</b>
<b>Control de calidad.....</b>	<b>10</b>
<b>Análisis de los resultados de las muestras de los recién nacidos .....</b>	<b>10</b>
<b>LIMITACIONES DE LA MEDICION.....</b>	<b>10</b>
<b>INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>10</b>
<b>RENDIMIENTO.....</b>	<b>11</b>
<b>CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS .....</b>	<b>11</b>
<b>GARANTIA.....</b>	<b>12</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMEN DEL ENSAYO.....</b>	<b>13</b>

## INTRODUCCIÓN

La Proteína Asociada a la Pancreatitis (PAP, también conocida como Reg3A) es sintetizada por el páncreas en respuesta al sufrimiento pancreático. En el caso de la 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 está elevada en la sangre de los recién nacidos afectados (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 MucoPAPII está destinado a la determinación cuantitativa de PAP en muestras de sangre de recién nacidos depositadas en los cartones de pesquisa calibrados y aprobadas por las autoridades competentes. Este es un inmunoensayo tipo sándwich que usa la técnica de revelación enzimática (ELISA). El rango de referencia del ensayo, así como los controles internos, se presentan en forma de manchas de sangre depositadas en cartones de pesquisa calibrados, al igual que las muestras a analizar.

Los pocillos de la placa de microtitulación están recubiertos con anticuerpos anti-PAP. Los eluidos de las manchas de sangre se depositan en los pocillos y la PAP que contienen se une a los anticuerpos específicos. Las proteínas que no son fijadas se eliminan por lavado. A continuación, los anticuerpos anti-PAP marcados con biotina se depositan en los pocillos y se unen a la PAP inmovilizada. Luego del lavado, el complejo antígeno-anticuerpo es detectado por un 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. La detención de la reacción enzimática mediante la adición de ácido transforma el color azul en amarillo, medible por espectrofotometría a 450 nm. La intensidad del color emitido 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 posiblemente un filtro de 630 nm para restar la intensidad residual de la coloración azul a la densidad óptica medida a 450 nm)
- Ordenador acoplado al espectrofotómetro para el análisis de los resultados
- Micropipetas automáticas monocanal y multicanal
- Recipiente de un litro (tampón de lavado)
- Sacabocados manual o automático para cortar discos de papel de filtro con 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 cromógeno y ácido
- Manchas de sangre de recién nacidos sobre cartones de pesquisa calibrados y aprobadas 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 controles internos.

REACTIVOS	CONSERVACIÓN ANTES DE LA APERTURA	CARACTERÍSTICAS DE USO	CONSERVACIÓN DESPUÉS 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 bolsitas con desecante durante 30 días como máximo.
Rango de PAP de referencia		Manchas de sangre en papel de filtro calibrado para perforar y eluir en 150 µL de PBS durante una noche (16h) entre +2°C y +8°C.	
Controles internos			
Anticuerpos anti-PAP biotinilados	Estable entre +2°C y +8°C hasta la fecha de caducidad.	Liofilizado que debe tomarse suavemente en 11 mL de agua destilada, directamente en el frasco.	Conservar a -20°C durante 30 días como máximo.
Conjugado avidina-peroxidasa			
Sustrato cromogénico (TMB)		Frasco de 15 mL. Listo para su utilización.	Conservar entre +2°C y +8°C durante 30 días como máximo.
Ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )		Frasco de 11 mL. Listo para su utilización	
Pastilla de PBS		Disolver en 1 L de agua destilada. Reservar 20 mL para la elución de las manchas de sangre.	Conservar a -20°C el tampón de lavado preparado durante 30 días como máximo.
Solución de Tween 20		Añadir a los 980 mL restantes de PBS para obtener el tampón de lavado.	

El kit se puede usar dentro de los 30 días posteriores a la apertura si se aplican correctamente las recomendaciones enumeradas en la tabla anterior.

Tal como lo suministra Dynabio, el kit de ensayo MucoPAPII 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 de PAP	Papel de filtro que contiene 2 series de 6 muestras de sangre secas suplementadas con PAP	0 µg PAP/L de sangre 0,39 µg PAP/L de sangre 0,78 µg PAP/L de sangre 1,56 µg PAP/L de sangre 3,13 µg PAP/L de sangre 6,25 µg PAP/L de sangre
Controles internos	Papel de filtro que contiene 2 series de 3 muestras de sangre secas suplementadas con PAP	Low: 1 µg PAP/L de sangre Medium: 2 µg PAP/L de sangre High: 3 µg PAP/L de sangre
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
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 de cromogénico de la enzima peroxidasa 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB)	≤ 0,05%
Ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	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 en el país de uso.

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 los alícuotas de sangre sobre el papel de filtro estandarizado. También proporciona instrucciones sobre el manejo, el transporte y la conservación adecuados de las muestras para asegurarse resultados de la calidad de los resultados en la pesquisa neonatal.

## **ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

Este kit sólo debe ser utilizado para uso de diagnóstico *in vitro* y solo por personal específicamente capacitado con los equipos de protección adecuados.

Las manchas de sangre secas de los pacientes, gama y control, así como los anticuerpos biotinilados, contienen elementos sanguíneos de origen humano o animal: deben ser considerados como potencialmente infecciosos y deben ser manipulados tomando las precauciones necesarias para la protección del usuario.

Consulte la Ficha de Datos de Seguridad del dispositivo para su eliminación. Los residuos deben eliminarse de acuerdo con las normas vigentes en el país de uso.

No 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Evitar 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.

## **RECOMENDACIONES PARA EL USO**

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

Evitar cualquier contaminación biológica o química de las muestras.

No utilice reactivos obsoletos.

No mezcle reactivos de diferentes lotes.

Equilibre todos los reactivos a temperatura ambiente (entre +19°C y +22°C) y agítelos antes de usarlos.

Evitar cualquier 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 deben realizarse con cuidado para evitar un aumento del ruido de fondo.

Nunca permita que la placa se seque, lo que afectaría la calidad de los resultados.

Los reactivos liofilizados (anticuerpos biotinilados y 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 uso.

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.eu](mailto:info@dynabio.eu) o por teléfono llame al +33 (0)4 86 94 85 04.

## **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y LOS ESTÁNDARES**

### El día antes de la cuantificación:

Disolver la tableta de PBS suministrada en 1 L de agua destilada. Después de la homogeneización completa, utilizar 20 mL para la elución de las manchas de sangre: los restantes 980 mL se mantienen entre +2°C y +8°C hasta el día siguiente, día del ensayo, 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 °C y +8°C.

**Rango de referencia:** Al igual que las muestras a analizar, perforar una pastilla de 3 mm de diámetro en los cartones de la gama, imperativamente en la periferia de la mancha. Los 6 puntos de la gama se perforarán por duplicado. Colocar cada pastilla en uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo redondo (no incluida en el kit). Añadir 150 µL de tampón PBS en cada pocillo. Eluir al menos durante 16h (una noche) a una temperatura entre +2°C y +8°C. Se obtienen 6 puntos de la curva de referencia: 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 y 0 µg/L.

**Controles internos:** Al igual que para la curva de referencia, los 3 controles internos deben ser perforados en duplicado en el cartón calibrado propuesto en el kit, imperativamente en la periferia de la mancha (pastillas de 3 mm de diámetro). Colocar cada pastilla en un pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo (no incluida en el kit). Añadir 150 µL de tampón PBS en cada pocillo. Eluir al menos durante 16h (una noche) a una temperatura entre +2°C y +8°C. La concentración de PAP en los tres controles es respectivamente de 1 µg/L (Low control), 2 µg/L (Medium control) y 3 µg/L (High control).

## PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

**Placa de ensayo:** La placa, envasada al vacío, debe equilibrarse a temperatura ambiente antes de ser extraída de su embalaje en papel de aluminio. Después de la apertura, la placa debe ser identificada por el usuario para no confundirla con otra placa tratada el mismo día. También se deben identificar todas las tiras de cada placa (de A a H) para evitar invertirlas en el caso que se desprendan de su armazón durante los pasos de lavado.

**Tampón de lavado (PBS-0,1% Tween):** Añadir al resto de PBS disuelto el día anterior (980 mL) todo el contenido del frasco de Tween 20 (10%) provisto en el kit y homogeneizar la mezcla.

**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 después de homogeneización.

**Ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Solución líquida lista para su utilización después de homogeneización.

## REALIZACIÓN DE LA MEDICION

Se obtendrá una gama de PAP luego de la elución, en PBS, de las 6 concentraciones estándar provistas en el kit. Incluye soluciones de concentraciones de 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 y 0 µg/L, medidas por duplicado.

Cada punto de la gama, eluido por duplicado, se deposita, luego de su homogeneización, en la placa de microtitulación (100 µL/pocillo). Los puntales de las micropipetas deben cambiarse obligatoriamente entre cada homogeneización de eluido de puntos de rango. Los dos pocillos que recibirán 100 µL del punto a 0 µg/L servirán para evaluar el ruido de fondo del ensayo.

Los eluidos de las muestras de recién nacidos, así como los eluidos de los controles internos, se depositan, por duplicado, después de la homogeneización, en la placa de microtitulación (100 µL/pocillo). Los puntales de las micropipetas deben cambiarse obligatoriamente entre cada homogeneización de eluido de muestras o de controles.

Estos depósitos se incuban durante 3 horas a temperatura ambiente (+19°C a +22°C), cubriendo previamente la placa con un adhesivo.

Los pocillos se lavan entonces 5 veces como sigue, utilizando el tampón de lavado PBS/Tween previamente preparado:

- aspirar el contenido de los pocillos,
- llenar cada pocillo con ~300 µL de tampón PBS/Tween,
- repetir estos dos primeros pasos 4 veces,
- después del último lavado, eliminar el líquido residual invirtiendo vigorosamente la placa (en un fregadero o recipiente de desechos líquidos) y luego golpeándola sobre toallas de papel.

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

La solución de anticuerpos biotinilados se deposita inmediatamente (100 µL/pocillo) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, cubriendo la placa con un adhesivo.

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

Inmediatamente se añade el conjugado avidina-peroxidasa (100 µL/pocillo) y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente, cubriendo la placa con un adhesivo.

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

A continuación se añade el sustrato cromogénico (TMB) (100 µL/pocillo) y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente, colocando la placa cubierta con un adhesivo en la oscuridad.

A continuación de esta incubación de 15 minutos, aparece en los pocillos una coloración azul de intensidad variable: sin efectuar ningún lavado, añadir 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, utilizando un espectrofotómetro equipado con 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. Luego se resta la absorbancia a 630 nm de la de 450 nm para eliminar la intensidad residual de la coloración azul. Sin embargo, el filtro de 630 nm no es esencial.*

## CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

### Calibración

Se debe asignar una curva estándar a cada ensayo realizado. Si la dosificación del día incluye varias placas, se debe colocar una gama en cada placa.

Para obtener esta curva, primero es necesario calcular el ruido de fondo del ensayo, que corresponde al promedio de los valores obtenidos para el blanco (punto a 0 µg/L), y luego restarlo de los resultados brutos obtenidos para todos los puntos de rango.

Este ruido de fondo también debe restarse de la señal de cada réplica de controles y muestras antes de calcular el promedio de las dos réplicas.

La siguiente tabla es un ejemplo de los resultados obtenidos para un rango de referencia con un ruido de fondo promedio de una densidad óptica de 0,068 (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	0,064	0,072			
0,39	0,294	0,269	0,226	0,201	0,214
0,78	0,532	0,450	0,464	0,382	0,423
1,56	0,808	1,009	0,740	0,941	0,841
3,13	1,581	1,781	1,513	1,713	1,613
6,25	3,013	2,878	2,945	2,810	2,877

La curva estándar se construye utilizando la función  $[PAP] = f(\text{absorbancia media})$ , haciendo corresponder la absorbancia media de cada punto del rango a su concentración teórica y aplicando un ajuste de tipo logístico de 4 parámetros. Se recomienda el uso de un programa informático para calcular esta función a partir de los valores del rango de referencia. La concentración de PAP en eluidos de las manchas (controles y muestras) se calcula utilizando la ecuación de la curva así construida.

### Control de calidad

Se recomienda el uso de controles internos para asegurar la validez de los resultados. Los controles deben ser tratados de la misma manera que las muestras. En el kit se proporcionan tres controles correspondientes a concentraciones crecientes de PAP (low, medium, high). Estos controles deben incluirse en cada ensayo: si el ensayo del día incluye varias placas, los controles deben colocarse en cada placa.

Se recomienda que los controles no se desvíen +/-20% de su concentración teórica:

Control - Concentración teórica	Límite inferior	Límite superior
Low – 1 µg/L	0,8 µg/L	1,2 µg/L
Medium – 2 µg/L	1,6 µg/L	2,4 µg/L
High – 3 µg/L	2,4 µg/L	3,6 µg/L

Los resultados de las muestras deben ser validados solo si los resultados de los controles para ese ensayo cumplen con los criterios de aceptabilidad.

En el caso de un problema recurrente o alteración del rendimiento del ensayo, comuníquese con Dynabio S.A. por correo electrónico a [info@dynabio.eu](mailto:info@dynabio.eu) o por teléfono 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 pesquisa calibradas, perforadas con un diámetro de 3 mm, la concentración de PAP en sangre de cada recién nacido se obtiene directamente mediante la ecuación de la curva de rango  $[PAP] = f(\text{absorbancia promedio})$ .

### LIMITACIONES DE LA MEDICION

La información obtenida con el ensayo de PAP utilizando el kit MucoPAPII 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 junto con otra información clínica disponible.

Condiciones que pueden inducir resultados analíticos anormales:

- el cartón de cribado no está uniformemente saturado con sangre,
- 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.

Consulte también las secciones “Advertencias y precauciones” y “Recomendaciones de uso”.

### INTERPRETACIÓN 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 actualmente implementadas generalmente se desarrollan en tres etapas. En la primera, se mide el tripsinógeno inmunorreactivo (TIR) en todos los recién nacidos. En la segunda, se mide la PAP en los recién nacidos con alto valor para TIR. En los recién nacidos con TIR y PAP elevados, un tercer paso consiste en una prueba de diagnóstico, la prueba del sudor, o en la búsqueda de mutaciones en el gen CFTR, posiblemente seguida de una prueba del sudor en los recién nacidos que portan estas mutaciones.

La Haute Autorité de Santé llevó a cabo una revisión exhaustiva del rendimiento de las estrategias actualmente utilizadas y se publicó en 2015. Está disponible bajo el título “Lugar de la estrategia acoplando los ensayos TIR y PAP en el cribado sistemático de la fibrosis quística en Francia” en la siguiente dirección:

[http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1739994/fr/](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1739994/fr/).

Se recomienda consultar este análisis antes de implementar la pesquisa neonatal de fibrosis quística mediante una prueba de PAP.

## RENDIMIENTO

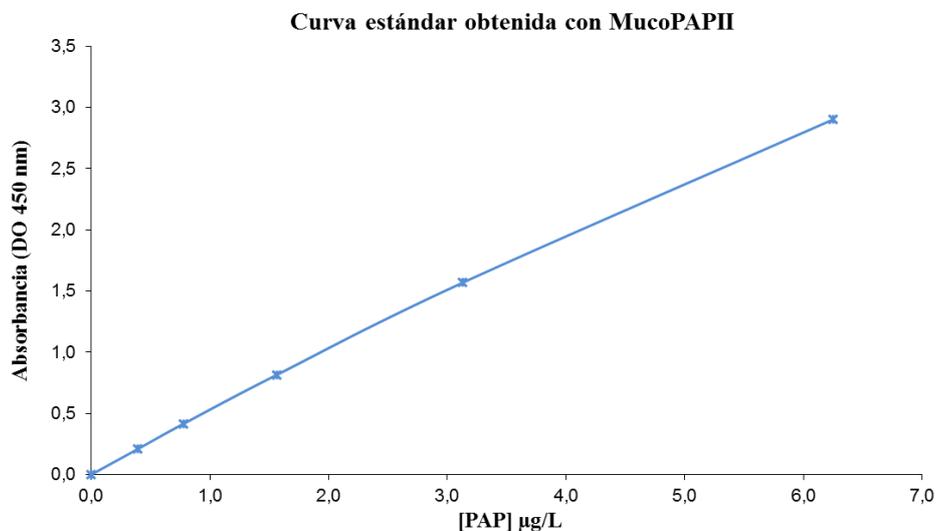
En los recién nacidos con TIR alta ( $> 50 \mu\text{g/L}$ ), todos los niños con fibrosis quística tienen una PAP  $> 1,5 \mu\text{g/L}$  (a excepción de las formas frustradas y de los bebés con íleo meconial). Los recién nacidos afectados representan aproximadamente el 25% de los recién nacidos con TIR alta y PAP  $> 1,5 \mu\text{g/L}$ . 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).

## CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

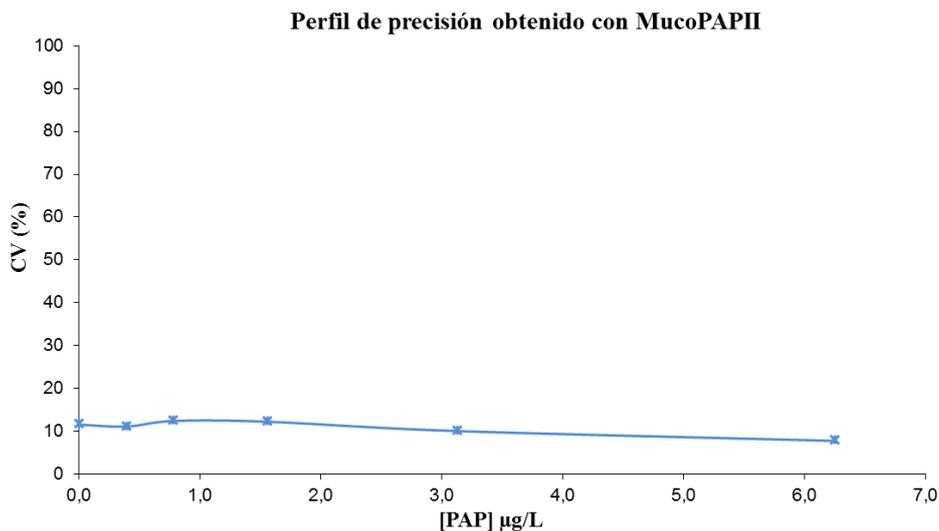
Todos los datos que se presentan a continuación fueron obtenidos con el instrumento Multiskan FC de Thermofisher Scientific, cuyas características son:

- Agitación de la placa antes de la lectura: 5 segundos
- Tipo de agitación de placa: continuo
- 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 el siguiente gráfico se muestra una curva estándar típica para el dispositivo MucoPAPII. Se determinó utilizando cuatro lotes diferentes y punzonando nueve veces los seis puntos de rango de cada lote.



**Perfil de precisión:** El perfil de precisión del dispositivo MucoPAPII se estableció usando cuatro lotes diferentes y perforando nueve veces los seis puntos de rango de cada uno. Se muestra a continuación.



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

La repetibilidad y reproducibilidad del dispositivo MucoPAPII se determinó utilizando cinco lotes diferentes y perforando nueve veces cada uno de los tres controles internos provistos en cada kit.

Valor esperado del control (µg/L)	Valor obtenido (µg/L)	Repetibilidad (CV en %)	Reproducibilidad (CV en %)
1	1,044	12,1	12,3
2	2,075	10,0	10,8
3	3,134	8,2	8,5

**Límites de detección y cuantificación:** Los límites de detección y cuantificación del ensayo MucoPAPII (expresados en microgramos de PAP por litro de sangre) son respectivamente de 0,084 µg/L y 0,143 µg/L considerando 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 MucoPAPII con moléculas IL2, IL6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y las proteínas de *Escherichia coli*.

**Efecto de gancho:** Ausencia de efecto de gancho hasta una concentración de PAP de 1000 µg/L, expresada en microgramos de PAP por litro de sangre.

## GARANTIA

Cualquier cambio o modificación del procedimiento recomendado por el fabricante puede afectar los resultados. En este caso, Dynabio S.A. renuncia a toda responsabilidad expresa, implícita o establecida por ley, incluida 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 se deriven de ello.

## REFERENCIAS

1. Ivanna *et al.* CR Acad Sci III. 1994;7:561-4.
2. Sarles *et al.* Arch Dis Child 1999;80:F118-22.
3. Bartolomé *et al.* Arco. Pediatr 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<sup>ème</sup> 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. Después de equilibrar a temperatura ambiente, retirar la placa de microtitulación de su estuche y, después de la homogeneización, depositar las eluciones del rango, de los tres controles y de las muestras (100 µL/pocillo, en doble).
3. Incubar durante 3h a temperatura ambiente.
4. Finalizar la preparación del tampón de lavado (añadiendo Tween en el PBS preparado el día anterior).
5. Al final de la incubación de 3h, llevar a cabo 5 lavados con PBS/Tween, vaciar la placa, secar.
6. Distribuir el anticuerpo biotinilado (100 µL/pocillo).
7. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Realizar 5 lavados con PBS/Tween, vaciar la placa, secar.
9. Distribuir el conjugado avidina-peroxidasa (100 µL/pocillo).
10. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
11. Realizar 5 lavados con PBS/Tween, vaciar la placa, secar.
12. Distribuir el sustrato cromogénico TMB (100 µL/pocillo).
13. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
14. Sin ningún lavado, parar la reacción añadiendo ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 µL/pocillo).
15. Leer la absorbancia a 450 nm.

## NOTAS