



IFU-MPK03-ES
Versión 11
Última revisión: 2022/08

MucoPAP-F

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

Patente INSERM

Fluoroimmunoensayo resuelto en el tiempo

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 9

France

Tel : +33 (0)4 86 94 85 04

www.dynabio.eu

REF MPK03

IVD

CE

SIMBOLOS



Para uso diagnóstico *in vitro*



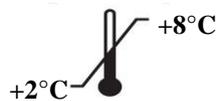
Número de lote



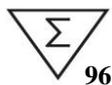
Número de catalogo



Fecha de caducidad (aaaa/mm/dd)



Guardar entre +2°C et +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.....	7
RECOMMANDACIONES PARA EL USO	7
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y LOS ESTANDARES	8
PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	8
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.....	12
REFERENCIAS.....	13
RESUMEN DEL ENSAYO.....	14

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-F está destinado 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 fluorescencia resuelta en el tiempo (Time Resolved Fluorescence, TRF). El rango de referencia de dosificación, así como los controles internos se presentan en forma de manchas de sangre depositadas en cartones de pesquisa calibradas, de la misma manera 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 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 estreptavidina-europio. Después de una nueva etapa de lavados, la adición de una solución de desarrollo de fluorescencia resulta en la ruptura de la unión entre la estreptavidina y el europio y luego el europio liberado es capturado por quelatos altamente fluorescentes. Estos quelatos emiten a una longitud de 620 nm tras excitación a 337 nm. La intensidad de fluorescencia 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
- Agitador de placas (orbital / 300 rpm = revoluciones por minuto)
- Lavador de placas (automático o semiautomático)
- Espectrofluorímetro para microplacas, equipado con un filtro 337 nm para la excitación y de un filtro 620 nm para la emisión
- Ordenador acoplado al espectrofluorímetro para el análisis de los resultados
- Micropipetas automáticas mono- y multicanales
- Botella de un litro (para el 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:

- Placas de 96 pocillos con fondo redondo (para la elución de las manchas de sangre)
- Puntas para micropipetas
- Pipetas de plástico de 10 mL
- Cuatro frascos identificados para los reactivos descartables (uno por reactivo): PBS, anticuerpos biotinilados, estreptavidina-europio y revelador de fluorescencia
- 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 los controles internos.

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 bolsitas con desecante durante 30 días como máximo.
Rango de referencia de PAP		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.
Tampón de dilución del conjugado		Frasco de 15 mL. Utilizar para diluir el conjugado estreptavidina-europio a 1/1000.	Conservar entre +2°C y +8°C durante 30 días como máximo.
Conjugado estreptavidina-europio		Diluir a 1/1000 en el tampón de dilución del conjugado. Preparar en el momento el volumen necesario.	No conservar la dilución al 1/1000 realizada en el tampón de dilución.
Solución de revelación de fluorescencia		2 frascos de 11 mL cada uno. Listos para su utilización.	Conservar entre +2°C y +8°C durante 30 días como máximo.
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.	

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

Tal como lo suministra Dynabio S.A., el kit de ensayo MucoPAP-F 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, que contiene agentes protectores	0,25 µg/mL
Tampón de dilución del conjugado	Solución salina a base de tampón Tris-HCl que contiene proteínas bovinas, detergente y agente antibacteriano	/
Conjugado estreptavidina-europio	Complejo de europio-estreptavidina en una solución salina a base de tampón Tris-HCl que contiene agentes protectores y antibacterianos	0,1 mg/mL
Solución de revelado de fluorescencia	Solución que contiene ácido acético, detergente y agentes quelantes	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
Pastilla de PBS	Tampón de fosfato salino	/
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). Si por alguna razón la muestra no se puede aplicar directamente sobre el papel de filtro, no utilice sangre recogida en presencia de reactivos de anticoagulantes (EDTA, citrato...) quelantes del europio porque podrían verán significativamente afectados los resultados del ensayo.

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 al 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, del rango y de los controles, 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, tampón de dilución, conjugado estreptavidina-europio y la solución de desarrollo de la fluorescencia. 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 de los eluidos.

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°C a +22°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.

El anticuerpo biotinilado liofilizado debe prepararse con al menos 10 minutos de anticipación para que su disolución sea completa y el reactivo homogéneo.

La solución de desarrollo de la fluorescencia es un reactivo termolábil y debe almacenarse entre + 2°C y + 8°C.

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 o por teléfono llame al +33 (0) 4 86 94 85 04.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y LOS ESTANDARES

El día antes de la cuantificación:

Disolver la tableta de PBS suministrada en 1 L de agua destilada. Luego de la homogenización 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 para preparar el tampón de lavado.

Muestras a analizar: Perforar 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 el mismo punto 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.

Curva 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 entonces 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 del cartón calibrado propuesto en el kit, imperativamente en la periferia del punto (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 de 1 µg/L (Low control), 2 µg/L (Medium control) y 3 µg/L (High control), respectivamente.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

El día de la cuantificación: Después de esta incubación durante la noche, todos los eluidos debe ser homogeneizados por succión y descarga antes de tomarse la muestra de 100 µL que 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 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 las etapas de lavado.

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

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

Tampón de dilución del conjugado: Este tampón debe ser homogeneizado y se utiliza para preparar la dilución 1/1000 de estreptavidina-europeo (ver abajo).

Europeo conjugado con estreptavidina (0,1 mg/mL): preparada la solución diluyendo el conjugado a 1/1000 en tampón de dilución para dar una concentración de 0,1 µg/mL. El volumen del conjugado diluido para preparar dependerá del número de pocillos que serán utilizados el mismo día. Esta dilución se debe preparar de forma extemporánea, durante la incubación del anticuerpo biotinilado en los pocillos.

Solución de revelado: listo para usar después de homogeneización.

REALIZACIÓN DE LA MEDICION

Se obtendrá una gama de PAP luego de la elución, en PBS, de las 6 concentraciones estándar proporcionadas en el kit. Se incluyen 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 entre cada homogeneización de eluido de puntos de gama. Los dos pozos 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 y de los controles internos se deposita por duplicado, luego de la homogeneización, en la placa de microtitulación (100 µL/pocillo). Los puntales de las micropipetas deberán 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), con agitación (orbital a 300 rpm), cubriendo previamente la placa con un adhesivo.

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

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

NB: Se recomienda el uso de un lavador automática o semiautomática.

La solución del anticuerpo biotinilado se deposita inmediatamente (100 µL/pocillo) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación (orbital a 300 rpm); la placa se cubre con un adhesivo.

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

El conjugado de estreptavidina-europio diluido a 0,1 µg/mL se añade inmediatamente (100 µL/pocillo) y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente con agitación (orbital a 300 rpm); la placa se cubre con un adhesivo.

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

A continuación, se añade la solución reveladora (**200 µL/pocillo**). No cubra la placa con el adhesivo por la posibilidad de apagar la señal.

Luego de 30 minutos mínimos de incubación con agitación (orbital a 300 rpm), se lee la fluorescencia usando un espectrofluorímetro, excitando a 337 nm longitud de onda y midiendo su emisión a 620 nm. La garantía de una señal estable y precisa sólo puede asegurarse si la placa se lee al menos 30 minutos después de la adición de la solución de revelado.

NB: El tiempo de incubación mínimo de la solución de revelado propuesto en este protocolo se determinó en un lector Fluostar Omega (BMG Labtech): consulte los detalles de la configuración de este equipo en "CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS".

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Calibración

Se debe asignar una curva estándar a cada ensayo. Si la dosis del día incluye varias placas, se deben incluir un rango 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 µg/L) y luego restarlo a los resultados brutos obtenidos para todos los puntos de gama.

Este ruido de fondo también se debe sustraer de la señal de cada replica del control y de las muestras antes de calcular el promedio de las dos replicas.

Ejemplo de resultados obtenidos para un rango de referencia con una media de ruido de fondo de 4125 unidades (a título indicativo):

PAP (µg/L)	Fluorescencia				
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1 - promedio del ruido de fondo	Réplica 2 - promedio del ruido de fondo	Promedio
0	4200	4050			
0,39	10617	11169	6492	7044	6768
0,78	20409	16023	16284	11898	14091
1,56	33079	32551	28954	28426	28690
3,13	58947	63764	54822	59639	57231
6,25	118902	116993	114777	112868	113823

La curva estándar se construye de acuerdo con la función $[PAP] = f(\text{intensidad media de fluorescencia})$, haciendo coincidir la fluorescencia media de cada punto de intervalo con su concentración teórica y aplicando una regresión lineal. 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 los 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 dosis: si la dosis del día incluye varias placas, se deben usar controles en cada placa. Se recomienda que los controles no se desvíen en +/- 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 sólo si los resultados de los controles para el ensayo cumplen con los criterios de aceptabilidad.

En el caso de un problema recurrente o un rendimiento alterado de la dosificación, póngase en contacto con Dynabio S.A. por correo electrónico a 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 el protocolo descrito anteriormente se respeta estrictamente y las muestras provienen de cartones de pesquisa calibradas, perforadas con un diámetro de 3 mm, la concentración sanguínea de PAP para cada recién nacido se obtiene directamente utilizando la ecuación de la curva de rango $[PAP] = f(\text{intensidad media de fluorescencia})$.

LIMITACIONES DE LA MEDICION

La información obtenida con el ensayo de PAP utilizando el kit MucoPAP-F 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.

La muestra de sangre no debe contener EDTA ni citrato ya que son quelantes de europio.

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 inmunorreactivo (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 seguida 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 (Haute Autorité de Santé) 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 alto ($> 50 \mu\text{g/L}$), todos los niños con fibrosis quística tienen PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$ (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 PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$. 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, 7).

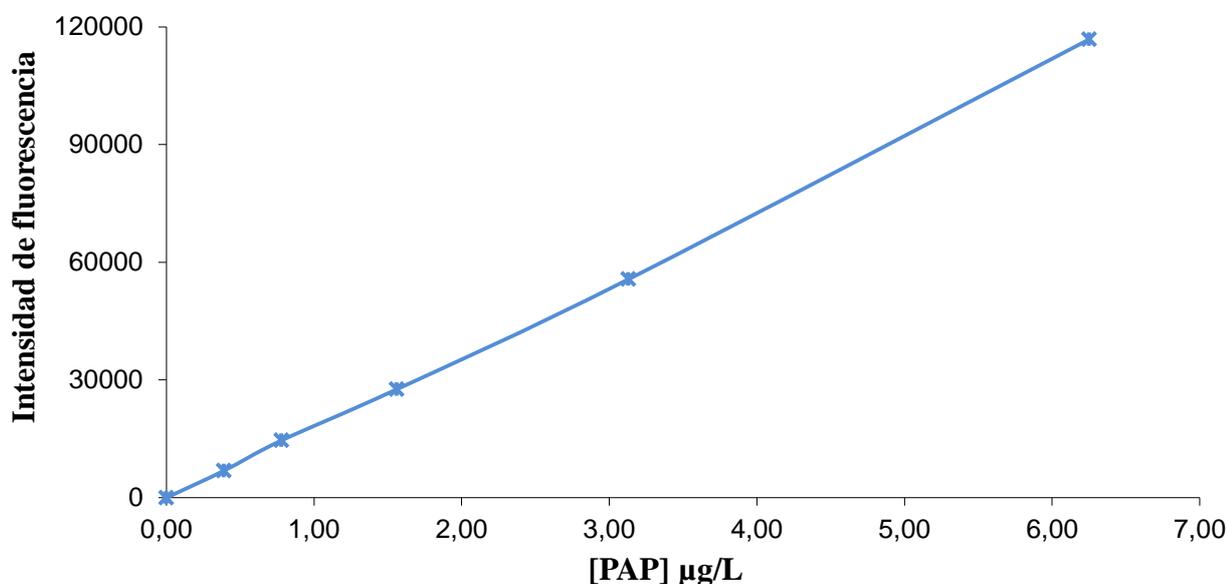
CARACTERISTICAS ANALITICAS

Todos los datos presentados a continuación se obtuvieron con el instrumento Fluostar Omega de BMG Labtech:

- Modo de lectura: TRF (Time Resolved Fluorescence)
- Filtro hipersensible,
- Filtro de excitación: 337 nm / Filtro de emisión: 620 nm
- Integración: 60 μs
- Duración: 400 μs
- Tiempo de pausa antes del inicio de la lectura: 0,2 segundos
- Número de destellos por pozo: 200

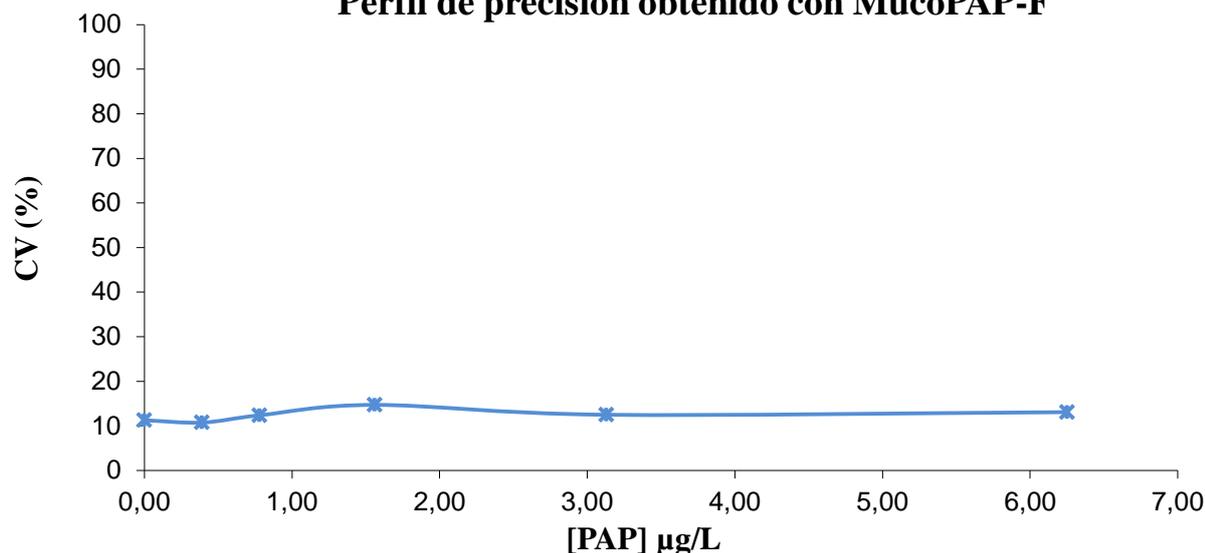
Curva estándar: En lo gráfico a continuación se muestra una curva estándar típico del dispositivo MucoPAP-F. Ella ha sido definida utilizando cuatro lotes diferentes de kits y perforando nueve veces los seis puntos de rango de cada uno de los kits.

Curva estándar obtenida con MucoPAP-F



Perfil de precisión: El perfil de precisión del dispositivo MucoPAP-F ha sido definido utilizando cuatro lotes diferentes de kits y perforando nueve veces los seis puntos de rango de cada uno de los kits. En lo gráfico a continuación se muestra este perfil.

Perfil de precisión obtenido con MucoPAP-F



Repetibilidad y reproducibilidad: La repetibilidad y la reproducibilidad del dispositivo MucoPAP-F se determinaron usando cinco lotes diferentes de kits y perforando once veces cada uno de los tres controles internos proporcionados en cada kit. La repetibilidad representa la variación dentro de un mismo lote (n = 11) y reproducibilidad entre lotes (n = 5).

Valor esperado del control (µg/L)	Valor obtenido (µg/L)	Repetibilidad (CV en %)	Reproducibilidad (CV en %)
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Límites de detección y cuantificación: Los límites de detección y cuantificación del ensayo MucoPAP-F (expresados en microgramos de PAP por litro de sangre) son respectivamente 0,24 µg/L y 0,32 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 MucoPAP-F 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 µg/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, 7ª edición, 2021). Clinical and Laboratory Standards Institute.
7. Weidler *et al.* J. Cystic Fibrosis 2016;15:752-758.

RESUMEN DEL ENSAYO

No se olvide de preparar las eluciones de las manchas de sangre con PBS (150 μ L/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 μ L/pocillo, en doble).
3. Incubar durante 3h a temperatura ambiente con agitación (orbital a 300 rpm).
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 μ L/pocillo).
7. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación (orbital a 300 rpm).
8. Realizar 5 lavados de PBS/Tween, vaciar el plato y secar.
9. Distribuir el conjugado estreptavidina-europio (100 μ L/pocillo).
10. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación (orbital a 300 rpm).
11. Realizar 5 lavados PBS/Tween, vaciar el plato y secar.
12. Dispensar la solución de revelado (200 μ L/pocillo).
13. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación (orbital a 300 rpm).
14. Leer la fluorescencia emitida a 620 nm luego de la excitación a 337 nm.

NOTAS