



IFU-MPK03-ET
Versioon 11
Viimati muudetud: 2022/08

MucoPAP-F

PAP mõõtmise komplekt vastsündinute tsüstilise fibroosi sõelumiseks

INSERM patent

Aja suhtes lahendatud fluorestsentsimmunoloogiline analüüs
Kasutusjuhend ja reaktiivid 96 proovi jaoks

Valmistanud :

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



SÜMBOLID



In vitro diagnostikaks



Partii number



Kataloogi number



Kehtivusaeg (aaaa/kk/pp)



Säilitada temperatuuril +2°C kuni +8°C



Sisaldab reaktiive 96 proovi jaoks



Märkus: lugege kasutusjuhendit



Tootja

SISU

SISSEJUHATUS.....	4
ANNUSTAMISE PÕHIMÕTE	4
DOSEERIMISE KS VAJALIKUD SEADMED JA TOOTED, MIDA EI TARNITA	4
KOMPLEKTI KOOSTIS.....	5
REAKTIIVIDE KIRJELDUS.....	6
PROOVIDE KOGUMINE JA TÖÖTLEMINE	6
HOIATUSED JA ETTEVAATUSABINÕUD	7
SOOVITUSED KASUTAMISEKS	7
PROOVIDE JA STANDARDITE ETTEVALMISTAMINE	7
REAKTIIVIDE VALMISTAMINE	8
ANALÜÜSI LÄBIVIIMINE	8
TULEMUSTE ARVUTAMINE.....	9
Kalibreerimine.....	9
Kvaliteedikontroll.....	9
Vastsündinute proovide tulemuste analüüs.....	10
DOSTEERIMISPIIRANGUD.....	10
TULEMUSTE TÕLGENDAMINE	11
JÕUDLUS	11
ANALÜÜTILISED OMADUSED	11
GARANTII	12
VIITED	13
ANNUSTAMISE KOKKUVÕTE	14

SISSEJUHATUS

Pankreatiidiga seotud valk (PAP, tuntud ka kui Reg3A) sünteesitakse kõhunäärme poolt kõhunäärme kannatuste ajal. Tsüstilise fibroosi korral on kõhunäärme juba *emakasiseselt* kahjustatud ja toodab PAP-i. Mitmed uuringud on näidanud, et PAP kontsentratsioon on haigestunud vastsündinute veres kõrgeks tõusnud (1, 2, 3, 4, 5).

Seega saab kalibreeritud sõeluuringukaartide PAP-analüüsi kasutada vastsündinute tuvastamiseks, kellel on tõenäoliselt tsüstiline fibroos.

ANNUSTAMISE PÕHIMÕTE

MucoPAP-F komplekt on ette nähtud PAP sisalduse kvantitatiivseks määramiseks vastsündinute vereproovides, mis on talletatud pädevate asutuste poolt heaks kiidetud kalibreeritud sõelumiskaartidele. Tegemist on võileviimmunoloogilise analüüsiga, milles kasutatakse ajas lahustunud fluorestsentsi (TRF) tehnikat. Analüüsi referentsvahemik ja sisekontrollid on esitatud kalibreeritud sõelumiskaartidel olevate verepiste kujul, nagu ka analüüsitavaid proovideid.

Mikrotitri plaadi augud on kaetud PAP-vastaste antikehadega. Verepunkti eluaadid ladustatakse kaevudesse ja neis sisalduv PAP seondub spetsiifiliste antikehadega. Valgud, mis ei seondu, eemaldatakse pesemisega. Seejärel lisatakse augudesse biotiiniga märgistatud anti-PAP-vastased antikehad, mis seonduvad immobiliseeritud PAP-ga. Pärast pesemist tuvastatakse antigeeni ja antikeha kompleks streptavidiini-europiumi kompleksiga. Pärast täiendavat pesu põhjustab fluorestsentsust suurendava lahuse lisamine streptavidiini ja europiumi vahelise sideme purunemise ja vabanenud europiumi kinnipüüdmise tugevalt fluorestseeruvate kelaatidena. Need kelaadid kiirgavad 620 nm juures pärast ergastamist 337 nm juures. Fluorestsentsi intensiivsus on proportsionaalne lähteeluaadis sisalduva PAPi kogusega.

DOSEERIMISEKS VAJALIKUD SEADMED JA TOOTED, MIDA EI TARNITA

Varustus:

- Vortex-segisti
- Plaadi raputussüsteem (orbitaalne / 300 p/min = pöörded minutis)
- Plaadipesumasin (automaatne või poolautomaatne)
- Spektrofluoromeeter mikroplaatide jaoks, mis on varustatud 337 nm ergutusfiltriga ja 620 nm emissioonifiltriga.
- Arvuti, mis on tulemuste analüüsimiseks lugejaga seotud
- Automaatsed ühe- ja mitmekanalilised mikropipetid
- 1 liitrine mahuti (pesupuhvri jaoks)
- Manuaalne või automaatne punker filterpaberi ketaste lõikamiseks läbimõõduga 3 mm
- Kaks liitrit destilleeritud vett

Ühekordselt kasutatavad seadmed :

- 96-kujuline ümarpõhjaline plaat (verepunktide elueerimiseks)
- Mikropipettide otsikud
- 10 mL plastpipetid
- Neli märgistatavat ühekordset reaktiivide mahutit (üks iga reaktiivi jaoks): PBS, biotüüritud antikehad, streptavidiin-europium ja avalduslahus
- Vastsündinute vereplekid pädevate asutuste poolt kalibreeritud ja heaks kiidetud sõelumiskaartidel

KOMPLEKTI KOOSTIS

Iga komplekt sisaldab reaktiive 96 proovi jaoks. Kõikidele komplektide etikettidele on trükitud aegumiskuupäev.

Mikrotiterplaadi esitamine eemaldatavate ribade kujul tähendab, et analüüsi saab kohandada vastavalt määratavate proovide arvule. Iga analüüs peab siiski sisaldama võrdlusvahemikku ja sisekontrolle.

REACTIVES	KONSERVATSIOON ENNE AVAMIST	FEATURES KASUTA	KONSERVATSIOON APRÈS AVAMINE
Mikrotiterplaat (96 süvendit 8 x 12 süvendi horisontaalsetes ribades)	Hoida pimedas kohas originaalpakendis. vahemikus +2°C kuni +8°C kuni aegumiskuupäevani.	Kaetud PAP-vastaste antikehadega. Valmis kasutamiseks.	Säilitada kuni 30 päeva temperatuuril +2°C kuni +8°C, kaasasolevas kuivatusaainega kotikeses.
Võrdlus PAP vahemik		Kalibreeritud filterpaberil olevad verepisteid lüüakse ja elueeritakse 150 µL PBS üleöö (16 tundi) temperatuuril +2°C kuni +8°C.	
Sisekontroll			
Biotiniilitud PAP-vastased antikehad	Säilib temperatuuril +2°C kuni +8°C kuni kõlblikkusaja lõpuni.	Lüofilisatsioon tuleb ettevaatlikult lahustada 11 mL destilleeritud veega otse viaalisse.	Hoida temperatuuril - 20°C kuni 30 päeva.
Konjugaadi lahjenduspuhver		15 mL pudel. Kasutage streptavidiin- euroopiumi konjugaadi lahjendamiseks 1:1000.	Hoida temperatuuril +2°C kuni +8°C kuni 30 päeva.
Streptavidiin-euroopiumi konjugaat		Lahjendage 1:1000 konjugaadi lahjenduspuhveris. Valmistage vajalik maht ekstemporalselt ette.	Ärge hoidke lahjenduspuhveris tehtud 1:1000 lahjendust.
Fluorestsentsuse arendamise lahendus (arendaja lahendus)		2 viaali, igaüks 11 mL. Valmis kasutamiseks.	Hoida temperatuuril +2°C kuni +8°C kuni 30 päeva.
PBS tablett		Lahustada 1 liitris destilleeritud vees. Eraldage 20 mL verepunkti elueerimiseks.	Säilitage ettevalmistatud pesupuhvrit temperatuuril -20 °C kuni 30 päeva.
Tween 20 lahus		Pesupuhvri saamiseks lisa ge ülejäanud 980 mL PBS.	

Sellistel tingimustel võib komplekti kasutada 30 päeva jooksul pärast avamist.

Dynabio S.A. poolt tarnitud MucoPAP-F analüüsikomplekt ei ole automatiseeritud.

REAKTIIVIDE KIRJELDUS

REACTIVES	KIRJELDUS	TOIMEAINE KONTSENTRATSIOON
Mikrotiterplaat (96 süvendit 8 x 12 süvendi horisontaalsetes ribades)	Hiire monoklonaalsete antikehadega kaetud kaevud, mis on spetsiifiliselt suunatud PAP vastu.	4 µg/mL
Võrdlus PAP vahemik	Filtripaber, mis sisaldab 2 komplekti 6 kuivanud vereplekki täiendatud PAP-ga	0 µg PAP/L veres 0,39 µg PAP/L veres 0,78 µg PAP/L veres 1,56 µg PAP/L veres 3,13 µg PAP/L veres 6,25 µg PAP/L veres
Sisekontroll	Filtripaber, mis sisaldab 2 komplekti 3 laiku kuivatatud verd, millele on lisatud PAP-meetodit.	Low: 1 µg PAP/L veres Medium: 2 µg PAP/L veres High: 3 µg PAP/L veres
Biotiniilitud PAP-vastased antikehad	Hiire monoklonaalsed antikehad, mis on spetsiifilised PAP suhtes, seotud biotiiniga, fosfaatpuhvis mis sisaldavad kaitsevahendeid	0,25 µg/mL
Konjugaadi lahjenduspuhver	Tris-HCl-puhvril põhinev soolalahus, mis sisaldab veiste valke, detergenti ja antibakteriaalseid ainet.	/
Streptavidiin-europiumi konjugaat	Europium-streptavidiini kompleks Tris-HCl-puhvril põhinevas soolalahuses, mis sisaldab kaitsvaid ja antibakteriaalseid aineid.	0,1 mg/mL
Fluorestsentsuse arendamise lahendus	Lahus, mis sisaldab äädikhapet, detergenti ja kelaatoreid	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
PBS tablett	soolalahuse fosfaatpuhver	/
Tween 20	Kontsentreeritud pesuvahendi lahus	10%

PROOVIDE KOGUMINE JA TÖÖTLEMINE

Vereproovid tuleb võtta kannapistega ja koguda otse heakskiidetud filterpaberile (võrdlusmeetod). Kui proovi ei saa kanda otse filterpaberile, ei tohi kasutada verd, mis on kogutud europiumi kelaatoreid sisaldavate antikoagulantide (EDTA, tsitraat) juuresolekul, sest see mõjutaks analüüsitulemusi.

Meetod ja täielik proovivõtuseade peavad vastama eeskirjadele.

Soovitav on tutvuda eeskirjadega, mis käsitlevad nõutava proovi tüüpi ja vastasündinute sõeluuringu programmi kohaselt sobivat proovi võtmise aega. Viimane määratleb ka selle, kui kiiresti pärast proovi võtmist tuleb teha PAP-analüüs.

Kuivatatud vereproovidel põhineva analüüsi tulemused sõltuvad otseselt sellest, kui hoolikalt proovi kogutakse, käideldakse, edastatakse ja säilitatakse. Dokumentatsioonis (6) on üksikasjalikult kirjeldatud proovide kogumise meetodeid ja vastuvõetavaid meetodeid vere tilkade või alikvootide kandmiseks standardiseeritud filterpaberile. Samuti esitatakse juhised proovide nõuetekohase käitlemise, transpordi ja säilitamise kohta, et tagada kvaliteetsed tulemused vastasündinute sõeluuringutes.

HOIATUSED JA ETTEVAATUSABINÕUD

Seda komplekti tohib kasutada ainult *in vitro* diagnostika eesmärgil spetsiaalselt koolitatud ja asjakohaseid kaitsevahendeid kandev personal.

Patsientide, vahemik ja kontrollide kuivatatud vereplekid ning biotiniilitud antikehad sisaldavad inim- või loomset päritolu vereelemente: neid tuleb pidada potentsiaalselt nakkusohtlikeks ja neid tuleb käidelda, võttes vajalikke ettevaatusabinõusid kasutaja kaitsmiseks.

Palun vaadake seadme ohutuskaardilt kõrvaldamisjuhiseid. Jäätmed tuleb hävitada vastavalt kasutusriigis kehtivatele eeskirjadele.

Ärge pipeteerige suhu.

Käsitsemise ajal ei tohi süüa, juua ega suitsetada.

Järgmised reaktiivid võivad olla mürgised või ärritavad: PBS, lahjenduspuhver, streptavidiini-europiumkonjugaat ja fluorestsentsuse arenduslahus. Vältida kokkupuudet naha, silmade ja limaskestadega. Juhusliku kokkupuute korral loputage põhjalikult veega.

Igast seadmega seotud tõsisest vahejuhtumist tuleb teavitada tootjat ja selle liikmesriigi pädevat asutust, kus kasutaja ja/või patsient asub.

SOOVIKES KASUTAMISEKS

Joonistage plaadi skeem ja järgige seda täpselt, määrates kindlaks, millises järjekorras viited, valged punktid, kontrollpunktid ja vastundinute proovid plaadile paigutatakse, et vältida segadust.

Vältida proovide bioloogilist või keemilist saastumist.

Ärge kasutage aegunud reaktiive.

Ärge segage eri partiide reaktiive.

Kõik reaktiivid tuleb tasakaalustada toatemperatuurini (+19°C kuni +22°C) ja enne kasutamist loksutada.

Vältige erinevate reaktiivide ristsaastumist: kasutage iga reaktiivi jaoks eraldi mahutit (mahuteid ei ole kaasas).

Järgige rangelt iga etapi puhul märgitud inkubatsiooniaega.

Pesu tuleb teostada hoolikalt, et vältida taustamüra suurenemist.

Ärge kunagi laske plaadil kuivada, sest see mõjutab tulemuste kvaliteeti.

Lüofiliseeritud biotiniilitud antikeha tuleb valmistada vähemalt 10 minutit varem, et tagada reaktiivi täielik lahustumine ja homogeensus.

Fluorestsentsuse arenduslahus on kuumalabiilne reaktiiv ja seda tuleb säilitada temperatuuril +2°C kuni +8°C.

Kui komplekt on transpordiajalkahjustatud (pudelid ümber lükatud ja/või purunenud, uuesti täidetud alumiiniumkotid), võtke palun ühendust Dynabio S.A.'ga e-posti aadressil info@dynabio.eu või telefonil +33 (0)4 86 94 85 04.

PROOVIDE JA STANDARDITE ETTEVALMISTAMINE

Mõõtmise eelõhtul:

Lahustage kaasasolev PBS-tablet 1 liitris destilleeritud vees. Pärast täielikku homogeniseerimist kasutage 20 mL vereplekkide elueerimiseks: ülejäänud 980 mL hoitakse +2 °C kuni +8 °C juures kuni järgmise päevani, mil toimub mõõtmine, et valmistada pesupuhvrit.

Analüüsitavaid proovide: Lõigake kartongist läbimõõduga 3 mm tükk, kindlasti verepleki äärelt, piirkonnast, kus veri on kartongi täielikult läbinud, ilma ülemäärase koguse või topeltkogumiseta. Asetage tükk 96 ümmarguse põhjaga plaadi (ei kuulu komplekti) ühte auku. Kahekordse mõõtmise saamiseks võtke proov kahest erinevast kohast samal vereplekist. Lisage igasse kaevu 150 µL PBS-puhvrit. Eluge vähemalt 16 tundi (ühe öö) temperatuuril +2 °C kuni +8 °C.

Võrdlusvahemik: Nagu analüüsitavaid proovide, lõigake ka võrdlusvahemiku kartongist läbimõõduga 3 mm tükk, kindlasti laigu äärelt. Kõik kuus võrdluspunkti tuleb kahekordselt läbi torgata. Asetage iga tükk ühe ümmarguse põhjaga 96-augulise plaadi (ei kuulu komplekti) auku. Lisage iga auku 150 µL PBS-puhvrit. Eluge vähemalt 16 tundi (ühe öö) temperatuuril +2 °C kuni +8 °C. Saadakse kuus võrdluspunkti: 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 ja 0 µg/L.

Sisekontrollid: Nagu standardvaliku puhul, tuleb kolm sisekontrolli kahekordselt läbi torkida komplektis olevast kalibreeritud kartongist, tingimata laigu äärealalt (läbimõõduga 3 mm pastillid). Asetage iga pastill ühe ümmarguse põhjaga 96-augulise plaadi (ei kuulu komplekti) auku. Lisage 150 µL PBS-puhvrit iga auku. Eluge vähemalt 16 tundi (ühe öö) temperatuuril +2 °C kuni +8 °C. PAP-kontsentratsioon kolmes kontrollis on vastavalt 1 µg/L (Low control), 2 µg/L (Medium control) ja 3 µg/L (High control).

REAKTIIVIDE VALMISTAMINE

Analüüsi päev: Pärast seda üledoõ inkubatsiooni tuleb kõik proovid homogeniseerida aspiratsiooni ja refluksi abil, seejärel võtta 100 µL analüüsivat proovi. Mikropipettide otsikud tuleb vahetada pärast iga homogeniseerimist/standardproovi, kontrollproovi või vastsündinu proovi võtmist.

Doseerimisplaat: vaakumplaat tuleb enne alumiiniumpakendist eemaldamist tasakaalustada toatemperatuuril. Pärast avamist peab kasutaja plaadi identifitseerima, et mitte segi ajada seda teise samal päeval töödeldud plaadiga. Samuti peavad kõik iga plaadiriivad olema identifitseeritavad (A-st H-ni), et vältida nende segunemist, kui need pesu ajal raamist lahti lähevad.

Pesupuhver (PBS-0,1% Tween): Eelmisel päeval lahustatud ülejäänud PBS-ile (980 mL) lisatakse kaasasoleva Tween 20 (10%) pudeli sisu ja segatakse hästi.

Biotiniülitud antikehad: Liofiilpulber lahustatakse ettevaatlikult 11 mL destilleeritud vees otse viaalis. Pärast täielikku lahustumist ja homogeniseerimist on preparaat kasutusvalmis.

Konjugaadi lahjenduspuhver: pärast homogeniseerimist kasutatakse seda puhvrit streptavidiini-europiumkonjugaadi 1/1000 lahjenduse valmistamiseks (vt allpool).

Streptavidiini-europiumkonjugaat (0,1 mg/mL): lahjendage seda konjugaati 1:1000 lahjenduspuhvril, et saada kontsentratsioon 0,1 µg/mL. Valmistatava lahjendatud konjugaadi maht sõltub sel päeval kasutatavate süvendite arvust. See lahjendus tuleb valmistada ekstemporaalselt, biotiniülitud antikeha inkubeerimise ajal kaevudes.

Arenduslahus: kasutusvalmis pärast homogeniseerimist.

ANALÜÜSI LÄBIVIIMINE

PAP vahemik saadakse pärast komplektiga kaasasoleva kuue standardkontsentratsiooni elueerimist PBS. See sisaldab lahuseid kontsentratsioonidega 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 ja 0 µg/L, mis on saadud kahes eksemplaris.

Pärast homogeniseerimist kantakse iga vahemiku punkt, mis on elueeritud kahekordselt, analüüsiplaadile (100 µL/kausioon). Mikropipettide otsad tuleb vahetada iga homogeniseeritud vahemikupunkti vahel. Analüüsi taustamüra hindamiseks kasutatakse kahte süvendit, mis saavad 100 µL punkti 0 µg/L.

Pärast homogeniseerimist lisatakse vastsündinute proovipunktide ja sisekontrolliga saadud eluaadid kahes eksemplaris analüüsiplaadile (100 µL/kausioon). Mikropipettide otsad tuleb vahetada iga homogeniseeritud kontroll- või vastsündinu proovi vahel.

Doseerimiskilp inkubeeritakse 3 tundi toatemperatuuril (+19 °C kuni +22 °C), loksutades (orbitaalselt 300 pööret minutis), pärast kilbi katmist kaitsekilega.

Seejärel pestakse süvendeid 5 korda, kasutades eelnevalt valmistatud 0,1% PBS/Tween pesupuhvrit:

- Aspireerige kaevude sisu,
- Täitke iga süvend ~300 µL pesupuhvriga.
- Korrake neid kahte esimest sammu 4 korda,
- Pärast viimast pesu eemaldage jääkvedelik, pöörates plaati jõuliselt ümber (valamusse või vedelikupuhastusse) ja koputades seda seejärel imavale paberile.

NB: soovitatav on kasutada automaatset või poolautomaatset pesumasinat.

Biotiniilitud antikehade lahus kantakse kohe (100 µL/kaussi) ja inkubeeritakse 30 minutit toatemperatuuril, kusjuures plaati raputatakse (orbitaalringi 300 rpm), plaat on kaetud kleepkileega.

Plaati pestakse 5 korda, nagu eespool kirjeldatud.

Streptavidiini-europiumi konjugaadi lahus, mida lahjenduspuhvris lahjendati 0,1 µg/mL, lisati kohe (100 µL/kaussi) ja inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril segamise all (orbitaalne 300 rpm), plaat on kaetud kleepkileega.

Plaati pestakse 5 korda, nagu eespool kirjeldatud.

Seejärel lisatakse arenduslahus (**200 µL/ruumis**). Ärge katke plaati liimiga, sest see võib signaali kustutada.

Pärast vähemalt 30-minutilist inkubeerimist segamise all (orbitaalne 300 rpm) loetakse fluorestsents spektrofotomeetri abil, ergutades lainepikkusel 337 nm ja mõõtes emissiooni 620 nm juures. Stabiilne ja täpne signaal on tagatud ainult siis, kui plaati loetakse vähemalt 30 minutit pärast arenduslahuse lisamist.

NB: käesolevas protokollis esitatud arenduslahuse minimaalne inkubatsiooniaeg määrati Fluostar Omega lugeja (BMG Labtech) abil: vt selle seadme konfiguratsiooni üksikasju punktis "ANALÜÜTILISED OMADUSED".

TULEMUSTE ARVUTAMINE

Kalibreerimine

Iga tehtud mõõtmise jaoks tuleb valmistada standardkõver. Kui päevane mõõtmine hõlmab mitut plaati, tuleb mõõtevahemik määrata igale plaadile.

Selle kõvera saamiseks tuleb esmalt arvutada taustmüra, mis vastab valge proovi keskmisele väärtusele (punkt 0 µg/L), ja seejärel lahutada see kogu vahemiku punktide toorandmetest.

See taustmüra tuleb lahutada ka iga kontrollkorduse ja proovi signaalist enne kahe korduse keskmise arvutamist.

Näide tulemustest, mis saadi võrdlusvahemiku puhul, mille taustmüra keskmine oli 4125 lööki (esitatud illustreerivalt):

PAP (µg/L)	Fluorestsents				
	Vastus 1	Vastus 2	Vastus 1 - keskmine taustamüra	Vastus 2 - keskmine taustamüra	Keskmine
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

Standardkõver ehitatakse funktsiooni $[PAP] = f(\text{keskmine fluorestsentsi intensiivsus})$ alusel, viies iga vahemiku punkti keskmise fluorestsentsi vastavusse selle teoreetilise kontsentratsiooniga ja rakendades lineaarregressiooni. Soovitatav on kasutada arvutiprogrammi, mis võimaldab arvutada selle funktsiooni võrdlusvahemiku väärtuste alusel. PAP kontsentratsioon plekkide eluati (kontrollid ja proovid) arvutatakse nii koostatud kõvera võrrandi abil.

Kvaliteedikontroll

Tulemuste kehtivuse tagamiseks on soovitatav kasutada sisekontrolli. Kontrolli tuleks käsitleda samamoodi nagu proove. Komplektis on kolm kontrolli, mis vastavad PAPI suurenevale kontsentratsioonile (low, medium, high). Need kontrollid tuleb lisada igasse analüüsi: kui päeva analüüs koosneb mitmest plaadist, tuleb kontrollid panna igale plaadile. Soovitatav on, et kontrollid ei kalduks teoreetilisest kontsentratsioonist kõrvale rohkem kui +/-20%:

Kontroll - teoreetiline kontsentratsioon	Madal piirväärtus	Kõrge piirnorm
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

Proovitulemusi tuleks valideerida ainult siis, kui selle analüüsi kontrollitulemused vastavad vastuvõetavuse kriteeriumidele.

Korduva probleemi või proovi tulemuslikkuse muutumise korral võtke palun ühendust Dynabio S.A.'ga e-posti aadressil info@dynabio.eu või telefonil +33 (0)4 86 94 85 04.

Vastsündinute proovide tulemuste analüüs

PAP-kontsentratsiooni arvutamine vastsündinute veres: kui eespool kirjeldatud protokoll on rangelt järgitud ja kui proovid pärinevad kalibreeritud sõelkastidest, mille läbimõõt on 3 mm, saadakse PAP-kontsentratsioon iga vastsündinu veres otse, kasutades vahemikukõvera võrrandit $[PAP] = f(\text{keskmine fluorestsentsi intensiivsus})$.

DOSTEERIMISPIIRANGUD

MucoPAP-F komplekti abil saadud teavet PAP-analüüsi kohta tuleks kasutada täiendusena teistele tsüstilise fibroosi sõeluuringu raames tehtavatele analüüsidele (nt IRT-analüüs). Seda tuleb tõlgendada muu kättesaadava kliinilise teabe valguses.

Tingimused, mis võivad põhjustada ebanormaalseid analüüsitulemusi :

- testkaart ei ole ühtlaselt verrega küllastunud,
- proov on lõigatud liiga lähedale proovivõtuala servale,
- proovi lõigati proovi keskelt, mitte selle äärealalt,
- proovi ei ole nõuetekohaselt kogutud ega kuivatatud,
- proov on olnud kokkupuutes kuumuse või niiskusega,
- papp on saastunud fekaalidega.

Vereproov ei tohi sisaldada EDTA-d ega tsitraati, mis on europiumi kelaatorid.

Palun vaadake ka jaotisi "Hoiatused ja ettevaatusabinõud" ja "Soovitused kasutamiseks".

TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

PAP-kontsentratsiooni hindamist verepildides kasutatakse vastsündinute populatsiooni tuvastamiseks, kellel on kõrge risk tsüstilise fibroosi tekkeks. Praegu kasutatavad strateegiad hõlmavad üldiselt kolme etappi. Esimeses etapis uuritakse kõigi vastsündinute immunoreaktiivset trüpsiinogeeni (IRT). Teises etapis mõõdetakse PAP-i vastsündinutel, kellel on kõrge TIR. Kõrgenenud TIR- ja PAP-ga vastsündinutel tehakse kolmandas etapis kas diagnostiline test, higiproov, või otsitakse CFTR-geeni mutatsioone, millele võib järgneda higiproov vastsündinutel, kes kannavad neid mutatsioone.

Prantsusmaa riiklik tervishoiuamet viis läbi praegu kasutatavate strateegiate tulemuslikkuse põhjaliku ülevaate, mis avaldati 2015. aastal. See on kättesaadav pealkirja all *"Place de la stratégie couplant les dosages de la TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France"* alljärgneval aadressil:

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

Enne PAP-analüüsi sisaldava vastsündinute tsüstilise fibroosi sõeluuringu läbiviimist on soovitatav viidata sellele analüüsile.

JÕUDLUS

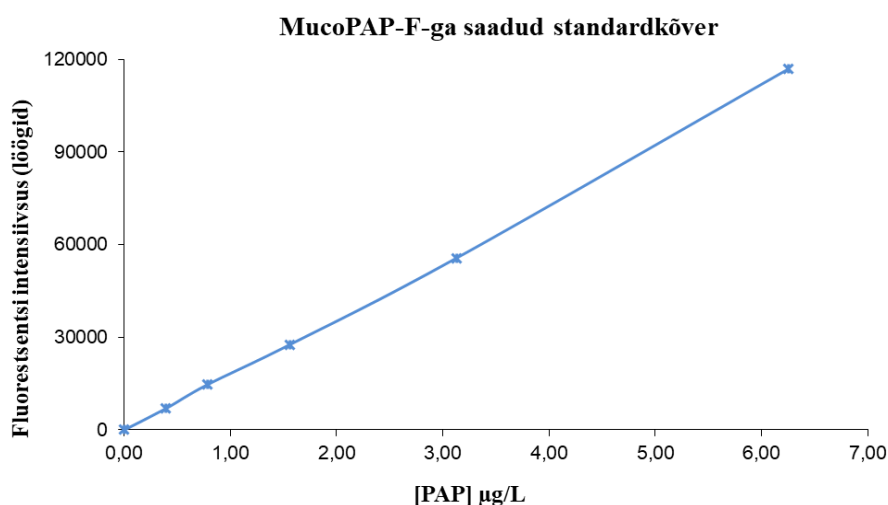
Kõrge TIR-väärtusega ($> 50 \mu\text{g/L}$) vastsündinutel on kõigil tsüstilise fibroosiga lastel $\text{PAP} > 1,75 \mu\text{g/L}$ (välja arvatud ebatäielikud vormid ja vastsündinud, kellel esineb mekonaalne ileus). Kannatanud vastsündinute osakaal on ligikaudu 25% vastsündinutest, kellel on kõrge TIR-väärtus ja $\text{PAP} > 1,75 \mu\text{g/L}$. Selle grupi haigestumata vastsündinute hulka kuuluvad enneaegsed lapsed, Downi sündroomiga lapsed ja raske seedetrakti infektsiooniga lapsed (4, 7).

ANALÜÜTILISED OMADUSED

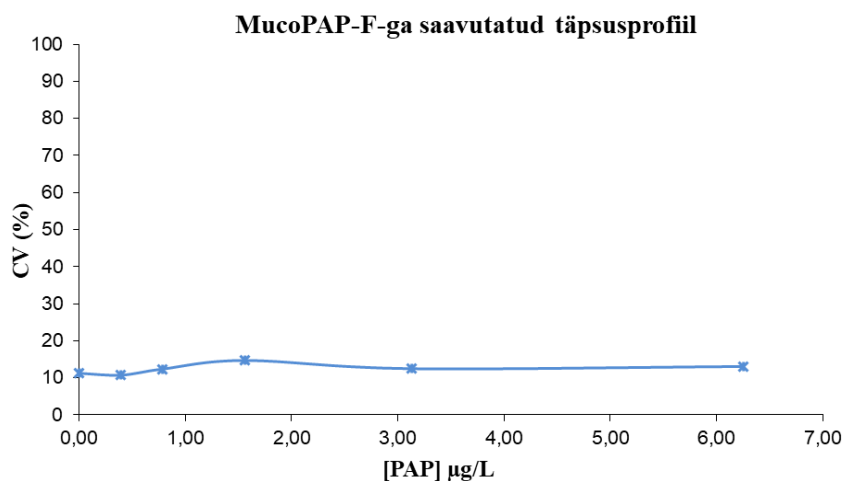
Kõik allpool esitatud andmed on saadud BMG Labtechi Fluostar Omega seadmega, mille omadused on järgmised:

- Lugemisrežiim: TRF (Time Resolved Fluorescence)
- Ülitundlik pea,
- Eksitatsioonifilter: 337 nm /emissioonifilter: 620 nm
- Integreerimine: 60 μs
- Kestus: 400 μs
- Paus enne lugemise algust: 0,2 sekundit
- Viljumiste arv ühe kaevu kohta: 200

Standardkõver: MucoPAP-F seadme tüüpiline standardkõver on näidatud alloleval graafikul. See määrati kindlaks, kasutades nelja erinevat partiid ja lüües iga partii kuus vahemikupunkti üheksa korda.



Täpsusprofiil: MucoPAP-F seadme täpsusprofiil määrati kindlaks, kasutades nelja erinevat partiid ja lüües iga partii puhul kuus vahemikupunkti üheksa korda. See on esitatud alljärgneval joonisel.



Korratavus ja reprodutseeritavus: MucoPAP-F seadme korratavus ja reprodutseeritavus määrati kindlaks, kasutades viit erinevat komplektide partiid ja lüües iga komplektiga kaasasolevat kolme sisekontrolli üksteist korda. Korratavus näitab partiisest varieeruvust (n= 11) ja reprodutseeritavus partiidevahelist varieeruvust (n= 5).

Eeldatav kontrollväärtus (µg/L)	Saadud väärtus (µg/L)	Korratavus (CV (%))	Reprodutseeritavus (CV (%))
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Avastamise ja kvantifitseerimise piirid: MucoPAP-F analüüsi avastamise ja kvantifitseerimise piirid (väljendatuna mikrogrammides PAP-i liitri vere kohta) on vastavalt 0,24 µg/L ja 0,32 µg/L, eeldades, et :

- avastamispäär on määratletud kui 3 standardhälvet nullistandardmõõtmiste keskmisest suurem.
- kvantifitseerimispäär on määratletud kui 10 standardhälvet nullistandardmõõtmiste keskmisest suurem.

Ristreaktiivsus: MucoPAP-F test ei reageerinud ristreaktsiooniga IL2, IL6, IFN γ , TNF α või *Escherichia coli* valkudega.

Konksu mõju: Konksu mõju puudub kuni PAP kontsentratsioonini 1000 µg/L, väljendatuna mikrogrammides PAP-i liitri vere kohta.

GARANTII

Tootja soovitatud menetluse muutmine või muutmise võib mõjutada tulemusi. Sellisel juhul keeldub Dynabio S.A. igasugusest otsesest, kaudsest või seadusega kehtestatud vastutusest, sealhulgas müügist või transpordist tulenevast vastutusest selle kasutamise eest. Sellisel juhul ei vastuta Dynabio S.A. sellest tuleneva otsese või kaudse kahju eest.

VII TED

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. 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^{ème} édition, 2021). Clinical and Laboratory Standards Institute.
7. Weidler *et al.* J. Cystic Fibrosis 2016;15:752-758.

DOOSIMISE KOKKUVÕTE

Ärge unustage valmistada vereplekkide elutsioonid 150 µL PBS/kaevikus doosimise eelõhtul ümmarguse põhjaga plaadil (ei kuulu komplekti)

1. Tooge doosimis- ja elutsioonplaadid toatemperatuurile.
2. Kui plaadid on toatemperatuuril, võtke analüüsplaad pakendist välja ja pärast homogeniseerimist asetage sellele proovid plekkidest, kolm kontrollproovi ja proovid (100 µL/ augu).
3. Inkubeerige 3 tundi toatemperatuuril, loksutades (orbitaalse loksutamisega 300 p/min).
4. Valmistage pesupuhver (lisage eelmisel päeval valmistatud PBS-ile Tweeni).
5. Pärast 3-tunnist inkubeerimist peske plaati 5 korda PBS/Tween, tühjendage plaat ja kuivatage koputades.
6. Jaotage biotüübitud antikehad (100 µL/augu).
7. Inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril, loksutades (orbitaalse loksutamisega 300 p/min).
8. Peske 5 korda PBS/Tween, tühjendage plaat ja kuivatage koputades.
9. Jaotage streptavidiin-europiumi konjugaat (100 µL/augu).
10. Inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril, loksutades (orbitaalse loksutamisega 300 p/min).
11. Peske 5 korda PBS/Tween, tühjendage plaat ja kuivatage koputades.
12. Jaotage avalduslahus (200 µL/augu).
13. Inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril, loksutades (orbitaalne loksutamine 300 p/min).
14. Mõõtke fluorestsents 620 nm juures pärast ergastamist 337 nm juures.

MÄRKUSED