



IFU-MPK03-HU
10-as verzió
Utolsó felülvizsgálat: 2022/05

MucoPAP-F

PAP-tesztkészlet a cisztás fibrózis újszülöttkori szűréséhez

INSERM szabadalom

Időfelbontású fluorimmunoanalízis

Használati utasítás és reagensek 96 teszthez

Gyártó :

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.com

REF MPK03

IVD

CE

SZIMBOLOK



In vitro diagnosztikai felhasználásra



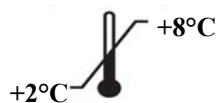
Tételszám



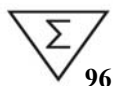
Katalógusszám



Lejárat dátum (éééé/hh/nn)



+2°C és +8°C között tárolandó



96 vizsgálatához szükséges reagenseket tartalmaz



Megjegyzés: Olvassa el a használati utasítást



Gyártó

ÖSSZEFOGLALÓ

BEVEZETÉS	4
AZ ADAGOLÁS ELVE	4
AZ ADAGOLÁSHOZ SZÜKSÉGES, NEM SZÁLLÍTOTT BERENDEZÉSEK ÉS TERMÉKEK	4
A KÉSZLET ÖSSZETÉTELE	5
A REAGENSEK LEÍRÁSA	6
MINTAVÉTEL ÉS FELDOLGOZÁS	6
FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK	7
HASZNÁLATI AJÁNLÁSOK	7
MINTA- ÉS STANDARD ELŐKÉSZÍTÉS	8
REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE	8
AZ ADAGOLÁS ELVÉGZÉSE	8
AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA	9
Kalibrálás	9
Minőségellenőrzés	10
Az újszülöttkori minták eredményeinek elemzése	10
ADAGOLÁSI KORLÁTOZÁSOK	10
AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE	10
TELJESÍTMÉNY	11
ANALITIKAI JELLEMZŐK	11
GARANCIA	12
HIVATKOZÁSOK	13
AZ ADAGOLÁS ÖSSZEFOGLALÁSA	13

BEVEZETÉS

A hasnyálmirigy-asszociált fehérjét (PAP, más néven Reg3A) a hasnyálmirigy szintetizálja a hasnyálmirigy szenvedése során. A cisztás fibrózisban a hasnyálmirigy már *méhen belül* károsodik, és PAP-ot termel. Számos tanulmány kimutatta, hogy a PAP koncentrációja emelkedett az érintett újszülöttek vérében (1, 2, 3, 4, 5).

A kalibrált szűrőkártyák PAP-mintája tehát képes azonosítani azokat az újszülötteket, akiknél valószínűleg cisztás fibrózis van.

AZ ADAGOLÁS ELVE

A MucoPAP-F kit a PAP mennyiségi meghatározására szolgál kalibrált és jóváhagyott szűrőkártyákon elhelyezett újszülöttkori vérmintákban. Ez egy szendvics-immunpróba, amely az időfelbontásos fluoreszcencia (TRF) technikát alkalmazza. Az analízis referencia tartománya és a belső kontrollok vérfoltokként vannak feltüntetve a kalibrált szűrőkártyákon, csakúgy, mint a vizsgálandó minták.

A mikrotiterlemez mélyedései anti-PAP antitestekkel vannak bevonva. A vérfoltok eluátumait a lyukakba helyezik, és a bennük lévő PAP kötődik a specifikus antitestekhez. A nem kötődő fehérjéket mosással távolítják el. Ezután biotin-jelölt anti-PAP antitesteket adunk a lyukakba, amelyek kötődnek az immobilizált PAP-hoz. Mosás után az antigén-antitest komplexet sztreptavidin-europium komplexszel detektáljuk. Egy további mosási lépést követően a fluoreszcenciát fejlesztő oldat hozzáadásával a sztreptavidin és az europium közötti kötés felszakad, és a felszabaduló europiumot erősen fluoreszkáló kelátokban rögzítik. Ezek a kelátok 337 nm-es gerjesztés után 620 nm-en emittálnak. A kibocsátott fluoreszcencia intenzitása arányos a kiindulási eluátumban lévő PAP mennyiségével.

AZ ADAGOLÁSHOZ SZÜKSÉGES, NEM SZÁLLÍTOTT BERENDEZÉSEK ÉS TERMÉKEK

Anyag:

- Vortex rázógép
- Tányérrázó (orbitális / 300 rpm = percenkénti fordulatszám)
- Lemezmosó (automata vagy félautomata)
- Spektrofluorométer mikrolemezekhez, 337 nm-es gerjesztő szűrővel és 620 nm-es emissziós szűrővel felszerelve
- Az eredmények elemzéséhez az olvasóval összekapcsolt számítógép
- Automatikus egy- és többcsatornás mikropipetták
- 1 literes tartály (mosópufferhez)
- Kézi vagy automatikus lyukasztó 3 mm átmérőjű szűrőpapír korongok vágásához
- Két liter desztillált víz

Egyszer használatos berendezések :

- 96 lyukú, kerek aljú lemez (a vérfoltok eluálásához)
- Tippek a mikropipettákhoz
- 10 ml-es műanyag pipetták
- Négy eldobható reagensgyűjtő tartály (reagensként egy): PBS, biotinilált antitestek, sztreptavidin-europium és fejlesztőoldat
- Újszülöttkori vérfoltok kalibrált, hatóság által jóváhagyott szűrőkártyákon

A KÉSZLET ÖSSZETÉTELE

Minden készlet 96 vizsgálathoz szükséges reagenseket tartalmaz. A szavatossági idő minden készlet címkéjén fel van tüntetve.

A mikrotiterlemez kivehető csíkokban van elhelyezve, így a vizsgálat a vizsgálandó minták számához igazítható. Minden egyes vizsgálatnak azonban tartalmaznia kell egy referenciatartományt és belső kontrollokat.

REAGENSEK	CONSERVATION NYITÁS ELŐTT	TULAJDONSÁGOK USE	CONSERVATION A MEGNYITÁST KÖVETŐEN
Mikrotiterlemez (96 furat 8 x 12 furatból álló vízszintes csíkokban)	Sötétben, eredeti csomagolásban tárolja +2°C és +8°C között a szavatossági idő lejártáig.	PAP-ellenes antitestekkel bevonva. Használatra kész.	A mellékelt kiszáritott tasakokban +2°C és +8°C között tárolható, legfeljebb 30 napig.
PAP referenciatartománya		A kalibrált szűrőpapíron lévő vérfoltokat ki kell lyukasztani és 150 µl PBS-ben egy éjszakán át (16 óra) +2°C és +8°C között eluálni kell.	
Belső ellenőrzések			
Biotinilált anti-PAP antitestek	A lejárati időig +2°C és +8°C között stabil.	A liofilizátumot óvatosan 11 ml desztillált vízben, közvetlenül az injekciós üvegbe kell felvenni.	-20°C-on 30 napig tárolható.
Konjugátum hígítási puffer		15 ml-es üveg. Használja a sztreptavidin-europium konjugátum 1:1000 arányú hígításához.	Legfeljebb 30 napig tárolható +2°C és +8°C között.
Streptavidin-europium konjugátum		Hígítsuk 1:1000 arányban a konjugátum hígítási pufferben. Készítse el a szükséges mennyiséget rögtönzéssel.	Ne tárolja az 1:1000-es hígítást hígítópufferben.
Fluoreszcencia fejlesztési megoldás (közzétételi megoldás)		2 db, egyenként 11 ml-es injekciós üveg. Használatra kész.	Legfeljebb 30 napig tárolható +2°C és +8°C között.
PBS tabletta		Oldjuk fel 1 liter desztillált vízben. Tegyen félre 20 ml-t a vérfoltok elúciójához.	Az elkészített mosópuffert -20°C-on tárolja 30 napig.
Tween 20 oldat		Adja hozzá a maradék 980 ml PBS-hez, hogy elkészüljön a mosópuffer.	

Ilyen feltételek mellett a készlet a felbontástól számított 30 napon belül felhasználható.

A Dynabio S.A. által szállított MucoPAP-F assay kit nem automatizált.

A REAGENSEK LEÍRÁSA

REAGENSEK	LEÍRÁS	A HATÓANYAG KONCENTRÁCIÓJA
Mikrotiter lemez (96 furat vízszintes 8 x 12 furatból álló csíkokban)	Speciálisan PAP ellenes egér monoklonális antitestekkel bevont kutak	4 µg/mL
PAP referenciatartománya	Szűrőpapír, amely 2 készlet 6 szárított vérfoltot tartalmaz, PAP-mal kiegészítve	0 µg PAP/L vér 0,39 µg PAP/L vér 0,78 µg PAP/L vér 1,56 µg PAP/L vér 3,13 µg PAP/L vér 6,25 µg PAP/L vér
Belső ellenőrzések	Szűrőpapír, amely 2 készlet 3 szárított vérfoltot tartalmaz, PAP-val kiegészítve	Low: 1 µg PAP/L vér Medium: 2 µg PAP/L vér High: 3 µg PAP/L vér
Biotinilált anti-PAP antitestek	PAP-specifikus egér monoklonális antitestek, biotinnal összekapcsolva, foszfát pufferben védőanyagokat tartalmazó	0,25 µg/ml
Konjugátum hígítási puffer	Tris-HCl puffer alapú sóoldat, amely szarvasmarhafehérjéket, detergenset és antibakteriális szert tartalmaz.	/
Streptavidin-europium konjugátum	Europium-streptavidin komplex, Tris-HCl puffer sóoldatban, amely védő- és antibakteriális hatóanyagokat tartalmaz	0,1 mg/ml
Fluoreszcencia fejlesztési megoldás	Ecetsavat, mosószeret és kelátort tartalmazó oldat	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
PBS tabletta	Só foszfát puffer	/
Tween 20	Koncentrált mosószeroldat	10%

MINTAVÉTEL ÉS FELDOLGOZÁS

A vérmintákat sarkszűrővel kell venni, és közvetlenül jóváhagyott szűrőpapírra kell gyűjteni (referencia-módszer). Ha a mintát nem lehet közvetlenül a szűrőpapírra felvinni, ne használjon olyan vért, amelyet europium kelátképző antikoaguláns reagens (EDTA, citrát) jelenlétében gyűjtöttek, mert ez befolyásolja a vizsgálati eredményeket.

A módszernek és a teljes mintavételi eszköznek meg kell felelnie az előírásoknak.

Javasoljuk, hogy az aktuális újszülött-szűrés programnak megfelelően konzultáljon a szükséges minta típusára és a mintavétel megfelelő időtartamára vonatkozó előírásokkal. Ez utóbbi meghatározza a PAP-vizsgálat időkeretét is a mintavételt követően.

A szárított vérmintákon alapuló vizsgálatok eredményei közvetlenül függenek a minták gyűjtése, kezelése, átadása és tárolása során tanúsított gondosságtól. A dokumentáció (6) pontosan leírja a mintavétel módszereit és a vércseppek vagy aliquoták standardizált szűrőpapírra történő felvitelének elfogadható technikáit. Emellett utasításokat ad a minták megfelelő kezelésére, szállítására és tárolására vonatkozóan, hogy biztosítsa a minőségi eredményeket az újszülöttkori szűrővizsgálatok során.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

Ezt a készletet *in vitro* diagnosztikai célokra csak speciálisan képzett, megfelelő védőfelszereléssel rendelkező személyzet használhatja.

A szárított beteg-, tartomány- és kontrollvérfoltok és biotinilált antitestek emberi vagy állati eredetű vérelemeket tartalmaznak: potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni őket, és a felhasználó védelme érdekében a szükséges óvintézkedésekkel kell kezelni.

Az ártalmatlanítással kapcsolatban olvassa el a készülék biztonsági adatlapját. A hulladékot a felhasználás helye szerinti országban érvényes előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

Ne pipettázzon a szájba.

Ne egyen, ne igyon és ne dohányozzon kezelés közben.

A következő reagensek mérgezőek vagy irritálóak lehetnek: PBS, hígítási puffer, sztreptavidin-europium konjugátum és fluoreszcencia fejlesztő oldat. Kerülje a bőrrel, szemmel és nyálkahártyával való érintkezést. Véletlen érintkezés esetén alaposan öblítse le vízzel.

Az eszközzel kapcsolatos minden súlyos eseményről értesíteni kell a gyártót és annak a tagállamnak az illetékes hatóságát, amelyben a felhasználó és/vagy a beteg letelepedett.

HASZNÁLATI AJÁNLÁSOK

Állítson össze egy gondosan követendő lemezelrendezést, amely meghatározza a tartomány, a vak, a kontroll és az újszülött minták mélyedéseiben történő lerakódás sorrendjét, hogy elkerülje a lyukak felcserélését.

Kerülje a minták biológiai vagy kémiai szennyeződését.

Ne használjon lejárt szavatosságú reagenseket.

Ne keverje össze a különböző tételekből származó reagenseket.

Minden reagenseket szobahőmérsékletre (+19°C és +22°C között) kell kiegyenlíteni, és használat előtt fel kell rázni.

Kerülje el a különböző reagensek közötti keresztszennyeződést: használjon minden reagenshez külön tartályokat (a tartályok nem tartozék).

Szigorúan tartsa be az egyes lépéseknél megadott inkubációs időt.

A mosásokat óvatosan kell elvégezni, hogy elkerülhető legyen a háttérzaj növekedése.

Soha ne hagyja kiszáradni a lemezt, mert ez befolyásolja az eredmények minőségét.

A liofilizált biotinilált antitestet legalább 10 perccel korábban kell elkészíteni a reagens teljes feloldódásának és homogenitásának biztosítása érdekében.

A fluoreszcens fejlesztőoldat hőálló reagens, és +2°C és +8°C között kell tárolni.

A készlet szállítás közbeni sérülése esetén (kiömlött és/vagy törött fiolák, újra felfújott alumíniumzacskók), kérjük, vegye fel a kapcsolatot a Dynabio S. A. a info@dynabio.com e-mail címen vagy a +33 (0)4 86 94 85 04 telefonszámon.

MINTA- ÉS STANDARD ELŐKÉSZÍTÉS

Az adagolás előtti napon:

Oldja fel a mellékelt PBS tablettát 1 liter desztillált vízben. A teljes homogenizálás után 20 ml-t használjon fel a vérfoltok elúciójához: a maradék 980 ml tartsa +2°C és +8°C között másnapig, a vizsgálat napjáig, a mosópuffer elkészítéséhez.

Vizsgálendő minták: Vágjon ki egy 3 mm átmérőjű pelletet a kartonból egy olyan területen, ahol a vér teljesen átjárta a kartont, túlterhelés vagy kettős lerakódás nélkül. Helyezze a párnát egy 96 lyukú, kerek aljú lemez egyik mélyedésébe (a készletben nem szerepel). A duplikált vizsgálatához lyukassza ki ugyanazt a vérfoltot 2 különböző helyen. Adjunk 150 µl PBS puffert minden egyes mélyedésbe. Legalább 16 órán át (egy éjszakán át) eluáljon +2°C és +8°C között.

Referenciatartomány: Az adagolandó mintákhoz hasonlóan vágjon ki egy 3 mm átmérőjű lapocskát a tartománykártyákból, feltétlenül a folt peremén. A hat távolsági pontot két példányban kell lyukasztani. Helyezzen minden egyes betétet egy 96 lyukú, kerek aljú lemez (a készletben nem szerepel) egy mélyedésébe. Adjunk hozzá 150 µl PBS puffert mélyedésenként. Legalább 16 órán át (egy éjszakán át) eluáljon +2 és +8 °C között. Hat tartománypontot kaptunk: 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 és 0 µg/L.

Belső kontrollok: A tartományhoz hasonlóan a három belső kontrollt is két példányban kell kivágni a készlethez mellékelt kalibrált kartonból, feltétlenül a folt peremén (3 mm átmérőjű pelletek). Helyezzen minden egyes betétet egy 96 lyukú, kerek aljú lemez (a készletben nem szerepel) egy mélyedésébe. Adjunk hozzá 150 µl PBS puffert mélyedésenként. Legalább 16 órán át (egy éjszakán át) eluáljon +2 és +8 °C között. A PAP koncentrációja a három kontrollban 1 µg/l (Low control), 2 µg/l (Medium control) és 3 µg/l (High control).

REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

A vizsgálat napján: Az éjszakai inkubáció után az összes eluátumot homogenizálni kell aszpirálással és kiszorítással, amikor a vizsgálandó 100 µl-t veszik. A mikropipetták hegyét a homogenizált tartomány, a kontroll vagy az újszülöttkori vérminták minden egyes lerakása között ki kell cserélni.

Adagolólemez: A vákuum alatt lévő lemezt szobahőmérsékleten kell kiegyensúlyozni, mielőtt kiveszik az alumínium csomagolásból. A felbontás után a felhasználónak azonosítania kell a lemezt, hogy ne lehessen összetéveszteni egy másik, ugyanazon a napon feldolgozott lemezzel. Az egyes lemezek összes csíkját azonosítani kell (A-tól H-ig), hogy elkerülhető legyen a csíkok felcserélése, ha a mosási lépések során leválnának a keretükről.

Mosópuffer (PBS-0,1% Tween): Az előző nap feloldott maradék PBS-hez (980 ml) adjuk hozzá a mellékelt Tween 20 (10%) üveg tartalmát, és jól keverjük össze.

Biotinilált antitestek: A liofilizátumot óvatosan 11 ml desztillált vízzel, közvetlenül az injekciós üvegbe kell felvenni. Teljes feloldás és homogenizálás után felhasználásra kész.

Konjugátum hígító puffer: A homogenizálás után ezt a puffert a sztreptavidin-europium konjugátum 1:1000-es hígításának elkészítéséhez kell használni (lásd alább).

Streptavidin-Europium-konjugátum (0,1 mg/ml): hígítsa ezt a konjugátumot 1:1000 arányban hígítópufferben 0,1 µg/ml koncentrációra. Az elkészítendő hígított konjugátum mennyisége az adott napon használt kutak számától függ. Ezt a hígítást a biotinilált ellenanyagok a lyukakban történő inkubálásakor kell elkészíteni.

Fejlesztési oldat: homogenizálás után azonnal felhasználható.

AZ ADAGOLÁS ELVÉGZÉSE

A készletben található hat standard koncentráció PBS-ben történő elúciója után PAP tartományt kapunk. 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 és 0 µg/l koncentrációjú oldatokat tartalmaz, amelyeket két példányban kaptak.

Minden egyes, két példányban eluált tartománypontot a homogenizálás után az analízislemezbe helyezünk (100 µl/lyuk). A mikropipetták hegyét minden egyes homogenizált tartománypont között ki kell cserélni. Azt a két kutat, amelybe 100 µl 0 µg/L-es pont kerül, a vizsgálat háttérének értékelésére használják.

Az újszülöttkori foltok eluátumait és a belső kontrollok eluátumait a homogenizálás után kétszeresen adjuk az analízislemezhez (100 µl/lyuk). A mikropipetták hegyét minden egyes homogenizált kontroll- vagy újszülöttminta között ki kell cserélni.

Ezeket a lerakódásokat 3 órán át szobahőmérsékleten (+19 °C és +22 °C között), kevergetés mellett (300 fordulat/perc fordulatszám) inkubáljuk, a lemezt előzőleg ragasztóval lefedve.

Ezután a lyukakat ötször mossuk az alábbiak szerint, az előzőleg elkészített 0,1%-os PBS/Tween mosópufferrel:

- Szívja le a kutak tartalmát,
- Töltsünk minden egyes mélyedésbe ~300 µl mosópuffert.
- Ismétlje meg ezt az első két lépést 4-szer,
- Az utolsó mosás után távolítsa el a maradék folyadékot a tányér erőteljes megfordításával (mosogatóban vagy folyadék-hulladék-tartályban), majd papírtörölkőre koppintva.

Megjegyzés: ajánlott automata vagy félautomata mosógép használata.

A biotinizált antitestoldatot azonnal fel kell vinni (100 µl/lyuk), és 30 percig kell inkubálni szobahőmérsékleten, kevergetés mellett (orbitális mozgatás 300 rpm-nél), a lemezt pedig le kell fedni ragasztóval.

A lemezt a fent leírtak szerint ötször mossuk.

A 0,1 µg/ml-re hígított streptavidin-europium-konjugátum oldatot hígítópufferben azonnal hozzáadjuk (100 µl/lyuk), és 30 percig szobahőmérsékleten, kevergetés mellett (orbitális 300 fordulat/perc) inkubáljuk, miközben a lemezt ragasztóval fedjük le.

A lemezt ötször mossuk a fent leírtak szerint.

Ezután hozzáadjuk a fejlesztőoldatot (**200 µl/lyuk**). Ne fedje le a lemezt a ragasztóval, mert ez kiolthatja a jelzést.

Legalább 30 perces inkubálás után, kevergetés mellett (300 fordulat/perc fordulatszám) a fluoreszcenciát spektrofluorométerrel olvassuk le, 337 nm-es hullámhosszon gerjesztve és 620 nm-en mérve az emissziót. A stabil és pontos jel csak akkor garantálható, ha a lemez leolvasása legalább 30 perccel a fejlesztőoldat hozzáadása után történik.

Megjegyzés: az ebben a protokollban javasolt revelációs oldat minimális inkubációs idejét egy Fluostar Omega olvasón (BMG Labtech) határoztuk meg: lásd a készülék konfigurációjának részleteit az "ANALITIKAI JELLEMZŐK" című fejezetben.

AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

Kalibrálás

Minden egyes elvégzett vizsgálathoz standard görbét kell használni. Ha a napi vizsgálat több lemezből áll, a tartományt minden egyes lemezre fel kell helyezni.

E görbe előállításához először ki kell számítani a vizsgálat háttérét a vakpontra (0 µg/L pont) kapott értékek átlagaként, majd ki kell vonni az összes tartománypontra kapott nyers eredményekből.

Ezt a háttérét is le kell vonni az egyes kontroll- és mintaismétlések jeléből, mielőtt a két ismétlés átlagát kiszámítjuk.

Példa egy referencia tartományra kapott eredményekre, 4125 átlagos háttérszámlálással (jelzéseként megadva):

PAP (µg/L)	Fluoreszcencia				
	Válasz 1	Válasz 2	Válasz 1 - átlagos háttérzaj	Válasz 2 - átlagos háttérzaj	Átlagos
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

A standard görbét a [PAP] = f(átlagos fluoreszcencia-intenzitás) függvény szerint állítottuk össze, az egyes tartománypontok átlagos fluoreszcenciájának az elméleti koncentrációhoz való illesztésével és lineáris regresszió alkalmazásával. A referencia-tartomány értékeiből e függvény kiszámításához számítógépes program használata ajánlott. A foltok (kontrollok és minták) eluátumaiban lévő PAP-koncentrációt az így kialakított görbe egyenletének segítségével számoljuk ki.

Minőségellenőrzés

Az eredmények érvényességének biztosítása érdekében belső ellenőrzések alkalmazása ajánlott. A kontrollokat ugyanúgy kell kezelni, mint a mintákat. A készlet három kontrollt tartalmaz, amelyek megfelelnek a PAP növekvő koncentrációinak (low, medium, high). Ezeket a kontrollokat minden egyes vizsgálatban szerepeltetni kell: ha a napi vizsgálat több lemezből áll, a kontrollokat minden egyes lemezen el kell helyezni.

Ajánlatos, hogy az ellenőrzések ne térjenek el több mint +/-20%-kal az elméleti koncentrációtól:

Ellenőrzés - Elméleti koncentráció	Alacsony határérték	Magas határérték
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

A mintaeredményeket csak akkor kell validálni, ha az adott vizsgálat kontrolleredményei megfelelnek az elfogadhatósági kritériumoknak.

Ismétlődő problémák vagy a vizsgálat teljesítményének megváltozása esetén kérjük, lépjen kapcsolatba a Dynabio S.A. a info@dynabio.com e-mail címen vagy a +33 (0)4 86 94 85 04 telefonszámon.

Az újszülöttkori minták eredményeinek elemzése

Az újszülöttek vérében lévő PAP-koncentráció kiszámítása: Ha a fent leírt protokollt szigorúan követik, és a minták 3 mm átmérőjű, kalibrált szűrődobozokból származnak, a PAP vérkoncentrációját minden egyes újszülött esetében közvetlenül meg lehet kapni a tartománygörbe egyenletével [PAP] = f(átlagos fluoreszcencia-intenzitás).

ADAGOLÁSI KORLÁTOZÁSOK

A MucoPAP-F készlettel kapott PAP-tesztre vonatkozó információkat a tisztás fibrózis szűrésének részeként végzett egyéb vizsgálatok és tesztek (pl. IRT-teszt) kiegészítéseként kell használni. Ezt a rendelkezésre álló egyéb klinikai információk fényében kell értelmezni.

Olyan körülmények, amelyek rendellenes analitikai eredményekhez vezethetnek :

- a tesztkártya nem telítődik egyenletesen vérrel,
- a mintát túl közel vágják a mintavételi terület széléhez,
- a mintát a periféria helyett a folt közepén vágják,
- a mintát helytelenül gyűjtötték vagy szárították,
- a mintát hőnek vagy nedvességnek tették ki,
- a karton ürülékkel szennyezett.

A vérminta nem tartalmazhat EDTA-t vagy citrátot, amelyek az európaium kelátorait képezik.

Lásd még a "Figyelmeztetések és óvintézkedések" és a "Felhasználási javaslatok" című szakaszokat.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A vérfoltok PAP-koncentrációjának értékelését a tisztás fibrózis magas kockázatának kitett újszülöttek populációjának azonosítására használják. A jelenlegi stratégiák általában három lépésből állnak. Az első lépésben az immunreaktív tripszinogént (IRT) minden újszülöttnél meghatározzák. A másodikban a PAP értékét magas TIR-rel rendelkező újszülötteknél mérik. A magas TIR- és PAP-értékkel rendelkező újszülötteknél a harmadik lépés vagy egy diagnosztikus vizsgálat, a verejtékvizsgálat, vagy a CFTR-gén mutációinak keresése, amelyet esetleg verejtékvizsgálat követ az ilyen mutációkkal rendelkező újszülötteknél.

A jelenleg alkalmazott stratégiák teljesítményének kimerítő felülvizsgálatát a Haute Autorité de Santé végezte el, és 2015-ben tette közzé. A közlemény *"Place de la stratégie couplant les assays de la TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France"* címmel a következő címen érhető el http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1739994/fr/.

Ajánlott, hogy erre az elemzésre hivatkozzanak, mielőtt a PAP-tesztet tartalmazó újszülöttkori cisztás fibrózis szűrést bevezetnék.

TELJESÍTMÉNY

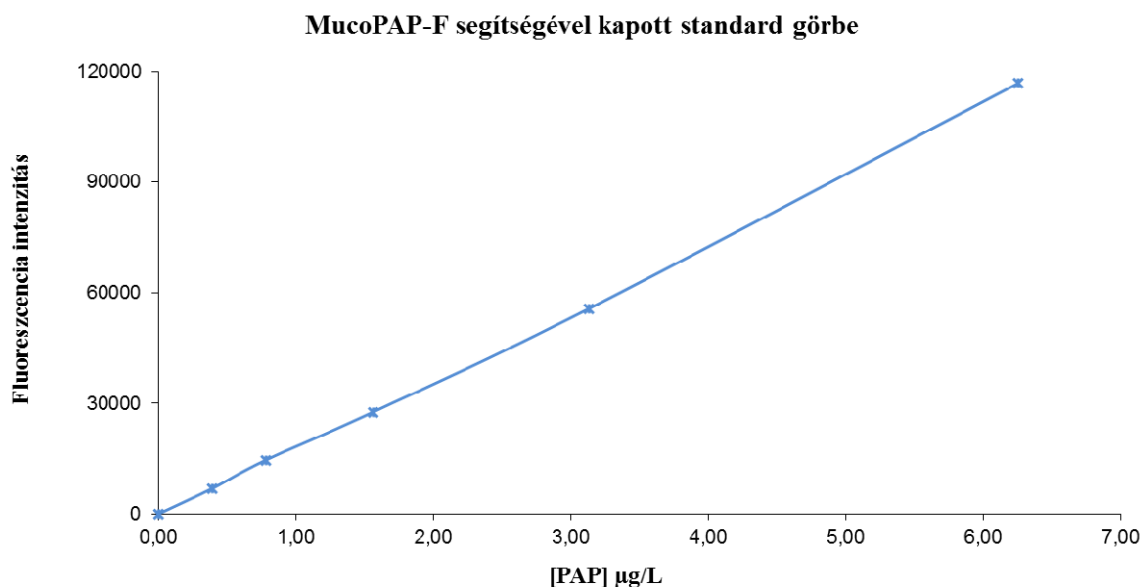
Az emelkedett TIR-értékkel ($> 50 \mu\text{g/L}$) rendelkező újszülötteknél minden cisztás fibrózisban szenvedő gyermek PAP-értéke $> 1,75 \mu\text{g/L}$ (kivéve a frusztrált formákat és a meconium ileusban szenvedő csecsemőket). Az érintett újszülöttek az emelkedett TIR-értékkel és $> 1,75 \mu\text{g/L}$ PAP-értékkel rendelkező újszülöttek mintegy 25%-át teszik ki. Az ebbe a csoportba tartozó nem érintett újszülöttek közé tartoznak a koraszülöttek, a Down-szindrómások és a súlyos GI-fertőzésben szenvedő csecsemők (4, 7).

ANALITIKAI JELLEMZŐK

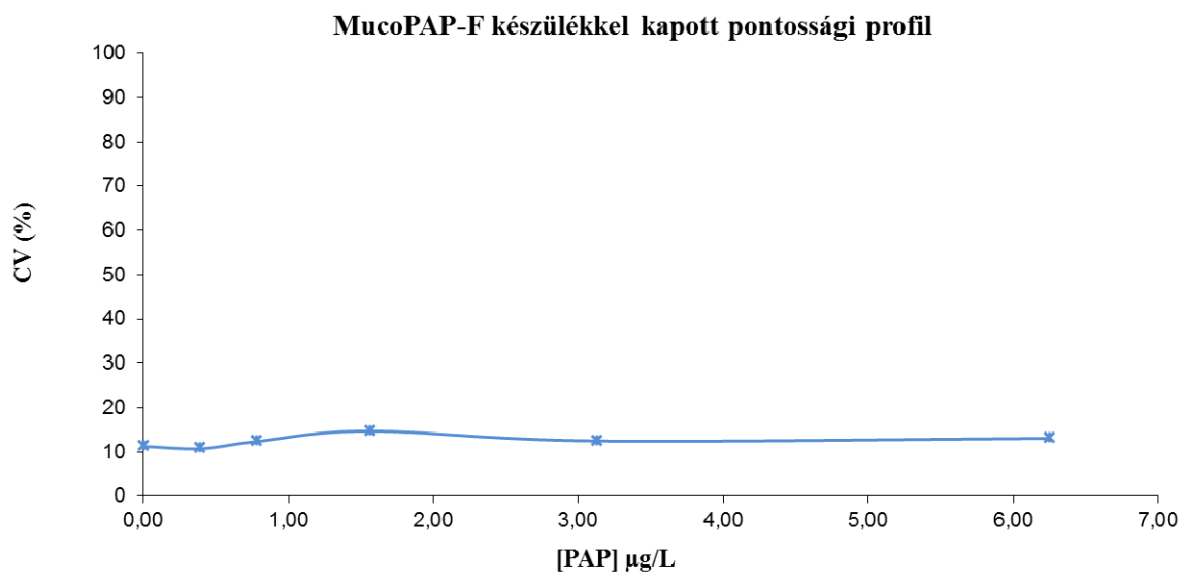
Az alábbiakban bemutatott összes adatot a BMG Labtech Fluostar Omega készülékével nyertük, amelynek jellemzői a következők

- Leolvasási mód: TRF (Time Resolved Fluorescence)
- Hiperérzékeny lehet,
- gerjesztő szűrő: 337 nm / emissziós szűrő: 620 nm
- Integráció: 60 μs
- Időtartam: 400 μs
- A lejátszás megkezdése előtti szünet ideje: 0,2 másodperc
- Villanások száma kútonként: 200

Standard görbe: A MucoPAP-F készülék tipikus standard görbéje az alábbi ábrán látható. Ezt úgy határozták meg, hogy négy különböző tételt használtak, és minden tételben kilencszer ütötték ki a hat tartománypontot.



Pontossági profil: A MucoPAP-F készülék pontossági profilját négy különböző tétel felhasználásával határoztuk meg, és minden tételben kilencszer lyukasztottuk ki a hat tartománypontot. Ezt az alábbi grafikon mutatja be.



Ismételhetőség és reprodukálhatóság: A MucoPAP-F készülék ismételhetőségét és reprodukálhatóságát öt különböző készlet tételeinek felhasználásával és az egyes készletekben található három belső kontroll mindegyikének tizenegyszeri lyukasztásával határozták meg. A megismételhetőség a tételen belüli eltérést (n = 11), a reprodukálhatóság pedig a tételek közötti eltérést (n = 5) jelenti.

Várható ellenőrzési érték (µg/L)	Kapott érték (µg/L)	Ismételhetőség (CV %-ban)	Reprodukálhatóság (CV %-ban)
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Kimutatási és mennyiségi határértékek: A MucoPAP-F vizsgálat kimutatási és mennyiségi határértéke (mikrogramm PAP per liter vérben kifejezve) 0,24 µg/L, illetve 0,32 µg/L, feltételezve, hogy :

- a kimutatási határértéket a nulla standard mérések átlaga feletti 3 standard eltérésként határozzák meg.
- a mennyiségi meghatározás határát a nulla standard mérések átlaga feletti 10 standard eltérésként határozzák meg.

Keresztreakció: A MucoPAP-F teszt során nem volt keresztreakció az IL2, IL6, IFN, TNF és *Escherichia coli* fehérjékkel.

Horgas hatás: 1000 µg/L PAP-koncentrációig nincs horgas hatás, mikrogramm PAP per liter vérben kifejezve.

GARANCIA

A gyártó által ajánlott eljárás bármilyen módosítása vagy módosítása befolyásolhatja az eredményeket. Ebben az esetben a Dynabio S.A. kizár minden kifejezett, hallgatólagos vagy törvény által megállapított felelősséget, beleértve a termék értékesítéséből vagy szállításából eredő felelősséget a termék használatáért. Ebben az esetben a Dynabio S.A. nem vállal felelősséget az ebből eredő közvetlen vagy közvetett károkért.

HIVATKOZÁSOK

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. Barthelley *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, 7th edition, 2021). Clinical and Laboratory Standards Institute.
7. Weidler *et al.* J. Cystic Fibrosis 2016;15:752-758.

AZ ADAGOLÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

Ne feledje, hogy a vérfolt eluátumokat 150 µl PBS/lyukban kell elkészíteni, a vizsgálatot megelőző napon egy kerek aljú lemezben (a készletben nem szerepel)

1. Hozza az analízis és az elúciós lemezeket szobahőmérsékletre.
2. A szobahőmérsékleten történő egyensúlyozás után vegyük ki az analitikai lemezt a tokból, és homogenizálás után adjuk hozzá a tartományfoltok, a három kontroll és a minták eluátjait (100 µl/lyuk).
3. Inkubáljuk 3 órán át szobahőmérsékleten, kevergetés mellett (300 fordulat/perc körforgással).
4. Fejezze be a mosópuffer elkészítését (adjon Tween-t az előző nap elkészített PBS-hez).
5. A 3 órás inkubáció végén végezzen el 5 PBS/Tween mosást, ürítse ki a lemezt, és törölje szárazra.
6. Adagoljon biotinilált ellenanyagot (100 µl/lyuk).
7. Inkubáljuk 30 percig szobahőmérsékleten, kevergetés mellett (orbitális forgatás 300 rpm).
8. Végezzen el 5 PBS/Tween mosást, ürítse ki a lemezt, törölje szárazra.
9. Adagoljon sztreptavidin-europium konjugátumot (100 µl/lyuk).
10. Inkubáljuk 30 percig szobahőmérsékleten, kevergetés mellett (orbitális forgatás 300 rpm).
11. Végezzen el 5 PBS/Tween mosást, ürítse ki a lemezt, törölje szárazra.
12. Adagolja ki a fejlesztőoldatot (200 µl/lyuk).
13. Inkubáljuk 30 percig szobahőmérsékleten, kevergetés mellett (orbitális forgatás 300 rpm).
14. A 337 nm-es gerjesztés után olvassa le a fluoreszcenciát 620 nm-en.

MEGJEGYZÉSEK