



IFU-MPK03-IT
Versione 10
Ultima revisione: 2022/05

MucoPAP-F

Kit PAP test per lo screening neonatale della fibrosi cistica

Brevetto INSERM

Fluoroimmunoassaggio risolto nel tempo

Istruzioni per l'uso e reagenti per 96 test

Prodotto da :

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

SIMBOLI



Per uso diagnostico *in vitro*



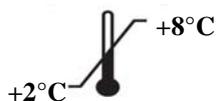
Numero di lotto



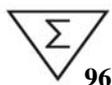
Numero di catalogo



Data di scadenza (aaaa/mm/gg)



Conservare tra +2°C e +8°C



Contiene reagenti per 96 test



Nota: leggere le istruzioni per l'uso



Produttore

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	4
PRINCIPIO DEL DOSAGGIO.....	4
ATTREZZATURE E PRODOTTI NON FORNITI NECESSARI PER IL DOSAGGIO.....	4
COMPOSIZIONE DEL KIT	5
DESCRIZIONE DEI REAGENTI.....	6
RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI.....	6
AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	6
RACCOMANDAZIONI PER L'USO.....	7
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E DELLO STANDARD	7
PREPARAZIONE DEI REAGENTI.....	8
ESECUZIONE DEL DOSAGGIO	8
CALCOLO DEI RISULTATI.....	9
Calibrazione	9
Controllo qualità.....	9
Analisi dei risultati dei campioni neonatali	10
LIMITAZIONI DEL DOSAGGIO	10
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	10
PRESTAZIONI.....	11
CARATTERISTICHE ANALITICHE.....	11
GARANZIA	12
RIFERIMENTI.....	12
SINTESI DEL DOSAGGIO	13

INTRODUZIONE

La proteina associata alla pancreatite (PAP, nota anche come Reg3A) viene sintetizzata dal pancreas durante la sofferenza pancreatica. Nella fibrosi cistica, il pancreas è già colpito *in utero* e produce PAP. Diversi studi hanno dimostrato che la concentrazione di PAP è elevata nel sangue dei neonati affetti (1, 2, 3, 4, 5).

Il PAP test sulle schede di screening calibrate può quindi identificare i neonati che probabilmente hanno la fibrosi cistica.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il kit MucoPAP-F è destinato alla determinazione quantitativa della PAP in campioni di sangue neonatale depositati su schede di screening calibrate e approvate. Si tratta di un immunodosaggio a sandwich che utilizza la tecnica della fluorescenza risolta nel tempo (TRF). L'intervallo di riferimento del test e i controlli interni sono presentati come macchie di sangue su schede di screening calibrate, così come i campioni da analizzare.

I pozzetti della piastra di microtitolazione sono rivestiti con anticorpi anti-PAP. Gli eluati delle macchie di sangue vengono depositati nei pozzetti e la PAP in essi contenuta si lega agli anticorpi specifici. Le proteine che non si legano vengono eliminate con il lavaggio. Gli anticorpi anti-PAP marcati con biotina vengono quindi aggiunti ai pozzetti e si legano alla PAP immobilizzata. Dopo il lavaggio, il complesso antigene-anticorpo viene rilevato da un complesso streptavidina-europio. Dopo un'ulteriore fase di lavaggio, l'aggiunta di una soluzione di sviluppo della fluorescenza provoca la rottura del legame tra streptavidina ed europio e la cattura dell'eurobio rilasciato in chelati altamente fluorescenti. Questi chelati emettono a 620 nm dopo l'eccitazione a 337 nm. L'intensità della fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di PAP contenuta nell'eluato di partenza.

ATTREZZATURE E PRODOTTI NON FORNITI NECESSARI PER IL DOSAGGIO

Materiale:

- Agitatore Vortex
- Agitatore a piastre (orbitale / 300 rpm = rotazioni al minuto)
- Lavastrade (automatica o semiautomatica)
- Spettrofluorimetro per micropiastre, dotato di un filtro da 337 nm per l'eccitazione e di un filtro da 620 nm per l'emissione
- Computer accoppiato al lettore per l'analisi dei risultati
- Micropipette automatiche monocanale e multicanale
- Contenitore da 1 litro (per il tampone di lavaggio)
- Punzone manuale o automatico per il taglio di dischi di carta da filtro con diametro di 3 mm
- Due litri di acqua distillata

Apparecchiature monouso:

- Piastra a fondo tondo da 96 pozzetti (per l'eluazione delle macchie di sangue)
- Suggestori per le micropipette
- Pipette di plastica da 10 mL
- Quattro contenitori monouso per reagenti annotativi (uno per reagente): PBS, anticorpi biotinilati, streptavidina-europio e soluzione sviluppatrice
- Macchie di sangue del neonato su schede di screening calibrate e approvate dalle autorità.

COMPOSIZIONE DEL KIT

Ogni kit contiene reagenti per 96 test. La data di scadenza è stampata su tutte le etichette dei kit.

La piastra per microtitolazione è presentata in strisce rimovibili, che consentono di adattare il test al numero di campioni da analizzare. Tuttavia, ogni analisi deve includere un intervallo di riferimento e controlli interni.

REAGENTI	CONSERVAZIONE PRIMA DELL'APERTURA	CARATTERISTICHE UTILIZZO	CONSERVAZIONE DOPO L'APERTURA
Piastra per microtitolazione (96 pozzetti in strisce orizzontali di 8 x 12 pozzetti)	Conservare al buio nella confezione originale tra +2°C e +8°C fino alla data di scadenza.	Rivestito con anticorpi anti-PAP. Pronto all'uso.	Conservare a +2°C a +8°C, nelle bustine essiccate fornite, per un massimo di 30 giorni.
Intervallo di riferimento delle PAP		Le macchie di sangue su carta da filtro calibrata devono essere perforate ed eluite in 150 µL di PBS durante la notte (16h) a +2°C - +8°C.	
Controlli interni			
Anticorpi anti-PAP biotinilati	Stabile tra +2°C e +8°C fino alla data di scadenza.	Il liofilizzato deve essere assunto delicatamente in 11 mL di acqua distillata, direttamente nella fiala.	Conservare a -20°C per un massimo di 30 giorni.
Tampone di diluizione del coniugato		Flacone da 15 mL. Utilizzare per diluire il coniugato streptavidina-europio 1:1000.	Conservare tra +2°C e +8°C per un massimo di 30 giorni.
Coniugato streptavidina-europio		Diluire 1:1000 in tampone di diluizione del coniugato. Preparare il volume necessario in modo estemporaneo.	Non conservare la diluizione 1:1000 fatta nel tampone di diluizione.
Soluzione di sviluppo in fluorescenza (soluzione di divulgazione)		2 fiale da 11 ml ciascuna. Pronto all'uso.	Conservare tra +2°C e +8°C per un massimo di 30 giorni.
Tavoletta PBS		Sciogliere in 1 L di acqua distillata. Mettere da parte 20 mL per l'eluizione delle macchie di sangue.	Conservare il tampone di lavaggio preparato a -20°C per un massimo di 30 giorni.
Soluzione Tween 20		Aggiungere ai restanti 980 mL di PBS per ottenere il tampone di lavaggio.	

In queste condizioni, il kit può essere utilizzato entro 30 giorni dall'apertura.

Come fornito da Dynabio S.A., il kit di analisi MucoPAP-F non è automatizzato.

DESCRIZIONE DEI REAGENTI

REAGENTI	DESCRIZIONE	CONCENTRAZIONE DI PRINCIPIO ATTIVO
Piastra per microtitolazione (96 pozzetti in strisce orizzontali di 8 x 12 pozzetti)	Pozzetti rivestiti con anticorpi monoclonali di topo specificamente diretti contro la PAP	4 µg/mL
Intervallo di riferimento delle PAP	Carta da filtro contenente 2 serie di 6 macchie di sangue essiccate integrate con PAP	0 µg PAP/L di sangue 0,39 µg PAP/L di sangue 0,78 µg PAP/L di sangue 1,56 µg PAP/L di sangue 3,13 µg PAP/L di sangue 6,25 µg PAP/L di sangue
Controlli interni	Carta da filtro contenente 2 serie di 3 macchie di sangue essiccato integrate con PAP	Low: 1 µg PAP/L di sangue Medium: 2 µg PAP/L di sangue High: 3 µg PAP/L di sangue
Anticorpi anti-PAP biotinilati	Anticorpi monoclonali di topo specifici per PAP, accoppiato alla biotina, in tampone fosfato contenenti agenti protettivi	0,25 µg/mL
Tampone di diluizione del coniugato	Soluzione salina a base di tampone Tris-HCl contenente proteine bovine, detergente e agente antibatterico	/
Coniugato streptavidina-europio	Complesso europio-streptavidina, in soluzione salina tampone Tris-HCl contenente agenti protettivi e antibatterici	0,1 mg/mL
Soluzione di sviluppo in fluorescenza	Soluzione contenente acido acetico, detergente e chelanti	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
Tavoletta PBS	Tampone fosfato salino	/
Tween 20	Soluzione detergente concentrata	10%

RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni di sangue devono essere prelevati mediante puntura del tallone e raccolti direttamente su carta da filtro approvata (metodo di riferimento). Se il campione non può essere applicato direttamente sulla carta da filtro, non utilizzare sangue raccolto in presenza di reagenti anticoagulanti chelanti l'eurobio (EDTA, citrato), che influiscono sui risultati del test.

Il metodo e il dispositivo di campionamento completo devono essere conformi alle normative.

Si raccomanda di consultare le norme relative al tipo di campione richiesto e al periodo appropriato per la raccolta del campione in base al programma di screening neonatale in corso. Quest'ultimo definisce anche i tempi di esecuzione del PAP test dopo la raccolta del campione.

I risultati di un'analisi basata su campioni di sangue secco sono direttamente correlati alla cura con cui vengono raccolti, manipolati, trasferiti e conservati i campioni. La documentazione (6) descrive accuratamente i metodi di raccolta dei campioni e le tecniche accettabili per applicare gocce o aliquote di sangue su carta da filtro standardizzata. Fornisce inoltre istruzioni sulla corretta manipolazione, trasporto e conservazione dei campioni per garantire risultati di qualità nello screening neonatale.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo kit deve essere utilizzato per scopi diagnostici *in vitro* solo da personale specificamente addestrato e dotato di adeguati dispositivi di protezione.

Gli spot ematici essiccati di pazienti, campioni e controlli e gli anticorpi biotinilati contengono elementi ematici di origine umana o animale: devono essere considerati potenzialmente infettivi e manipolati con le necessarie precauzioni per la protezione dell'utente.

Per lo smaltimento, consultare la scheda di sicurezza del dispositivo. I rifiuti devono essere smaltiti in conformità alle norme vigenti nel paese di utilizzo.

Non pipettare in bocca.

Non mangiare, bere o fumare durante la manipolazione.

I seguenti reagenti possono essere tossici o irritanti: PBS, tampone di diluizione, coniugato streptavidina-europio e soluzione di sviluppo della fluorescenza. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto accidentale, sciacquare abbondantemente con acqua.

Qualsiasi incidente grave relativo al dispositivo deve essere notificato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui si trova l'utilizzatore e/o il paziente.

RACCOMANDAZIONI PER L'USO

Stabilire un layout della piastra da seguire con attenzione, definendo l'ordine di deposizione nei pozzetti dei campioni dell'intervallo, del bianco, del controllo e del neonato, per evitare l'inversione delle punzonature.

Evitare la contaminazione biologica o chimica dei campioni.

Non utilizzare reagenti scaduti.

Non mescolare i reagenti di lotti diversi.

Equilibrare tutti i reagenti a temperatura ambiente (da +19°C a +22°C) e agitare prima dell'uso.

Evitare la contaminazione incrociata tra reagenti diversi: utilizzare un serbatoio diverso per ogni reagente (i serbatoi non sono forniti).

Rispettare rigorosamente il tempo di incubazione indicato per ogni fase.

I lavaggi devono essere eseguiti con cura per evitare un aumento del rumore di fondo.

Non lasciare mai che la lastra si asciughi per non compromettere la qualità dei risultati.

L'anticorpo biotinilato liofilizzato deve essere preparato con almeno 10 minuti di anticipo per garantire la completa dissoluzione e l'omogeneità del reagente.

La soluzione di sviluppo per la fluorescenza è un reagente termolabile e deve essere conservata a una temperatura compresa tra +2°C e +8°C.

In caso di danni al kit durante il trasporto (fiale rovesciate e/o rotte, sacchetti di alluminio rigonfiati), contattare Dynabio S.A. via e-mail all'indirizzo info@dynabio.com o telefonicamente al numero +33 (0)4 86 94 85 04.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E DELLO STANDARD

Il giorno prima del dosaggio :

Sciogliere la compressa di PBS fornita in 1 L di acqua distillata. Dopo l'omogeneizzazione completa, utilizzare 20 mL per l'eluizione degli spot di sangue: i restanti 980 mL vengono conservati a +2°C - +8°C fino al giorno successivo, quello del test, per preparare il tampone di lavaggio.

Campioni da analizzare : Ritagliare dal cartone un pallino di 3 mm di diametro in un'area in cui il sangue ha permeato completamente il cartone, senza sovraccarico o doppia deposizione. Posizionare il tampone in un pozzetto di una piastra a fondo tondo da 96 pozzetti (non fornita nel kit). Per ottenere un duplicato del test, punzonare in 2 punti diversi dello

stesso campione di sangue. Aggiungere 150 µL di tampone PBS in ogni pozzetto. Eluire per almeno 16 ore (overnight) a +2°C - +8°C.

Intervallo di riferimento: come i campioni da dosare, ritagliare un tampone di 3 mm di diametro dalle schede degli intervalli, imperativamente alla periferia del punto. I sei punti di distanza devono essere perforati in duplice copia. Posizionare ogni tampone in un pozzetto di una piastra a fondo tondo da 96 pozzetti (non fornita nel kit). Aggiungere 150 µL di tampone PBS per pozzetto. Eluire per almeno 16 ore (durante la notte) a +2°C - +8°C. Sono stati ottenuti sei punti di intervallo: 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 e 0 µg/L.

Controlli interni: come per l'intervallo, i tre controlli interni devono essere perforati in duplice copia dal cartoncino calibrato fornito nel kit, imperativamente alla periferia della macchia (tamponi di 3 mm di diametro). Posizionare ogni tampone in un pozzetto di una piastra a fondo tondo da 96 pozzetti (non fornita nel kit). Aggiungere 150 µL di tampone PBS per pozzetto. Eluire per almeno 16 ore (durante la notte) a +2 a +8°C. La concentrazione di PAP nei tre controlli è rispettivamente di 1 µg/L (Low Control), 2 µg/L (Medium Control) e 3 µg/L (High Control).

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Il giorno del test: dopo questa incubazione notturna, tutti gli eluati devono essere omogeneizzati mediante aspirazione e spostamento quando si prelevano i 100 µL da analizzare. Le punte delle micropipette devono essere cambiate tra ogni deposito di campioni di sangue omogeneizzati dell'intervallo, di controllo o neonatali.

Piastra di dosaggio: la piastra, sotto vuoto, deve essere bilanciata a temperatura ambiente prima di toglierla dalla confezione di alluminio. Dopo l'apertura, la piastra deve essere identificata dall'utente in modo da non confonderla con un'altra piastra elaborata nello stesso giorno. Tutte le strisce di ogni piastra devono essere identificate (da A a H) per evitare di scambiarle nel caso in cui si stacchino dal telaio durante le fasi di lavaggio.

Tampone di lavaggio (PBS-0,1% Tween): Al restante PBS sciolto il giorno precedente (980 mL), aggiungere il contenuto del flacone di Tween 20 (10%) fornito e mescolare bene.

Anticorpi biotinilati : Il liofilizzato viene delicatamente prelevato con 11 mL di acqua distillata direttamente nella fiala. È pronto per l'uso dopo la totale dissoluzione e omogeneizzazione.

Tampone di diluizione del coniugato: dopo l'omogeneizzazione, questo tampone viene utilizzato per preparare la diluizione 1:1000 del coniugato streptavidina-europio (vedi sotto).

Coniugato streptavidina-europio (0,1 mg/mL): diluire questo coniugato 1:1000 in tampone di diluizione fino a una concentrazione di 0,1 µg/mL. Il volume di coniugato diluito da preparare dipende dal numero di pozzetti utilizzati nella giornata. Questa diluizione deve essere preparata estemporaneamente durante l'incubazione dell'anticorpo biotinilato nei pozzetti.

Soluzione di sviluppo: pronta all'uso dopo l'omogeneizzazione.

ESECUZIONE DEL DOSAGGIO

Dopo l'eluizione in PBS delle sei concentrazioni standard fornite nel kit, si ottiene un intervallo PAP. Comprende soluzioni di concentrazione 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 e 0 µg/L, ottenute in doppio.

Ogni punto di intervallo, eluito in duplicato, viene depositato, dopo omogeneizzazione, nella piastra di dosaggio (100 µL/pozzetto). Le punte delle micropipette devono essere cambiate tra ogni punto dell'intervallo di omogeneizzazione. I due pozzetti che ricevono 100 µL del punto 0 µg/L saranno utilizzati per valutare il background del test.

Gli eluati degli spot neonatali e gli eluati dei controlli interni vengono aggiunti in duplice copia alla piastra del saggio (100 µL/pozzetto) dopo l'omogeneizzazione. Le punte delle micropipette devono essere cambiate tra ogni campione di controllo o neonato omogeneizzato.

Questi depositi vengono incubati per 3 ore a temperatura ambiente (da +19°C a +22°C), sotto agitazione (orbitale a 300 rpm), ricoprendo preventivamente la piastra con un adesivo.

I pozzetti vengono quindi lavati 5 volte come segue, utilizzando il tampone di lavaggio PBS/Tween allo 0,1% precedentemente preparato:

- Aspirare il contenuto dei pozzetti,

- Riempire ogni pozzetto con ~300 µL di tampone di lavaggio
- Ripetere questi primi due passaggi per 4 volte,
- Dopo l'ultimo lavaggio, rimuovere il liquido residuo capovolgendo energicamente la piastra (in un lavandino o in un contenitore per rifiuti liquidi) e poi battendola su un tovagliolo di carta.

NB: si raccomanda l'uso di una lavatrice automatica o semiautomatica.

La soluzione di anticorpo biotinitato viene applicata immediatamente (100 µL/pozzetto) e incubata per 30 minuti a temperatura ambiente con agitazione (orbitale a 300 rpm) e la piastra coperta di adesivo.

La piastra viene lavata 5 volte come descritto sopra.

La soluzione di coniugato streptavidina-europio diluita a 0,1 µg/mL in tampone di diluizione viene immediatamente aggiunta (100 µL/pozzetto) e incubata per 30 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione (orbitale a 300 rpm) con la piastra coperta di adesivo.

La piastra viene lavata 5 volte come descritto sopra.

Viene quindi aggiunta la soluzione sviluppatore (**200 µL/pozzetto**). Non coprire la piastra con l'adesivo per evitare di spegnere il segnale.

Dopo un'incubazione di almeno 30 minuti sotto agitazione (orbitale a 300 rpm), la fluorescenza viene letta con uno spettrofluorimetro, eccitando a una lunghezza d'onda di 337 nm e misurando l'emissione a 620 nm. Un segnale stabile e preciso può essere garantito solo se la piastra viene letta almeno 30 minuti dopo l'aggiunta della soluzione sviluppatore.

NB: il tempo minimo di incubazione della soluzione di rivelazione proposta in questo protocollo è stato determinato su un lettore Fluostar Omega (BMG Labtech): si vedano i dettagli della configurazione di questo dispositivo in "CARATTERISTICHE ANALITICHE".

CALCOLO DEI RISULTATI

Calibrazione

Per ogni analisi eseguita deve essere utilizzata una curva standard. Se il test del giorno è composto da più piastre, l'intervallo deve essere posizionato su ogni piastra.

Per ottenere questa curva, il fondo del test deve essere prima calcolato come media dei valori ottenuti per il bianco (punto 0 µg/L) e poi sottratto dai risultati grezzi ottenuti per tutti i punti dell'intervallo.

Anche questo fondo deve essere sottratto dal segnale di ciascuna replica di controllo e di campione prima di calcolare la media delle due repliche.

Esempio di risultati ottenuti per un intervallo di riferimento con un fondo medio di 4125 conteggi (dato indicativo):

PAP (µg/L)	Fluorescenza				Media
	Risposta 1	Risposta 2	Risposta 1 - rumore di fondo medio	Risposta 2 - rumore di fondo medio	
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 standard è costruita secondo la funzione $[PAP] = f(\text{intensità media di fluorescenza})$, facendo corrispondere la fluorescenza media di ciascun punto dell'intervallo alla sua concentrazione teorica e applicando una regressione lineare. Si raccomanda l'uso di un programma informatico per calcolare questa funzione dai valori dell'intervallo di riferimento. La concentrazione di PAP negli eluati degli spot (controlli e campioni) viene calcolata utilizzando l'equazione della curva così costruita.

Controllo qualità

Si raccomanda l'uso di controlli interni per garantire la validità dei risultati. I controlli devono essere trattati allo stesso modo dei campioni. Il kit contiene tre controlli corrispondenti a concentrazioni crescenti di PAP (low, medium, high). Questi controlli devono essere inclusi in ogni saggio: se il saggio del giorno è composto da più piastre, i controlli devono essere collocati su ogni piastra.

Si raccomanda che i controlli non si discostino di oltre il +/-20% dalla loro concentrazione teorica:

Controllo - Concentrazione teorica	Limite basso	Limite alto
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

I risultati dei campioni devono essere convalidati solo se i risultati dei controlli per quel test soddisfano i criteri di accettabilità.

In caso di problemi ricorrenti o di alterazione delle prestazioni del saggio, contattare Dynabio S.A. via e-mail all'indirizzo info@dynabio.com o per telefono al numero +33 (0)4 86 94 85 04.

Analisi dei risultati dei campioni neonatali

Calcolo della concentrazione di PAP nel sangue dei neonati: se il protocollo sopra descritto viene seguito rigorosamente e i campioni provengono da scatole di screening calibrate, forate con un diametro di 3 mm, la concentrazione di PAP nel sangue per ciascun neonato si ottiene direttamente utilizzando l'equazione della curva di intervallo $[PAP] = f(\text{intensità media di fluorescenza})$.

LIMITAZIONI DEL DOSAGGIO

Le informazioni sul PAP test ottenute con il kit MucoPAP-F devono essere utilizzate come complemento ad altri test e analisi (ad esempio il test IRT) eseguiti nell'ambito dello screening della fibrosi cistica. Deve essere interpretato alla luce delle altre informazioni cliniche disponibili.

Condizioni che possono portare a risultati analitici anomali :

- la card del test non è saturata di sangue in modo uniforme,
- il campione è stato tagliato troppo vicino al bordo dell'area di campionamento,
- il campione è stato tagliato al centro della macchia anziché alla periferia,
- il campione è stato raccolto o essiccato in modo non corretto,
- il campione è stato esposto a calore o umidità,
- il cartone è contaminato da materiale fecale.

Il campione di sangue non deve contenere EDTA o citrato, che sono chelanti dell'eurobio.

Vedere anche le sezioni "Avvertenze e precauzioni" e "Raccomandazioni per l'uso".

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La valutazione della concentrazione di PAP nelle macchie di sangue viene utilizzata per identificare una popolazione di neonati ad alto rischio di fibrosi cistica. Le strategie attuali prevedono generalmente tre fasi. Nella prima fase, viene misurato il tripsinogeno immunoreattivo (IRT) in tutti i neonati. Nel secondo, la PAP viene misurata nei neonati con TIR elevato. Nei neonati con TIR e PAP elevati, un terzo passo consiste in un test diagnostico, il test del sudore, o nella ricerca di mutazioni nel gene CFTR, eventualmente seguito da un test del sudore nei neonati con queste mutazioni.

Una revisione esaustiva delle prestazioni delle strategie attualmente in uso è stata condotta dalla Haute Autorité de Santé e pubblicata nel 2015. È disponibile con il titolo "*Place de la stratégie couplant les assages de la TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France*" al seguente indirizzo

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

Si raccomanda di fare riferimento a questa analisi prima di implementare uno screening neonatale per la fibrosi cistica che preveda un PAP test.

PRESTAZIONI

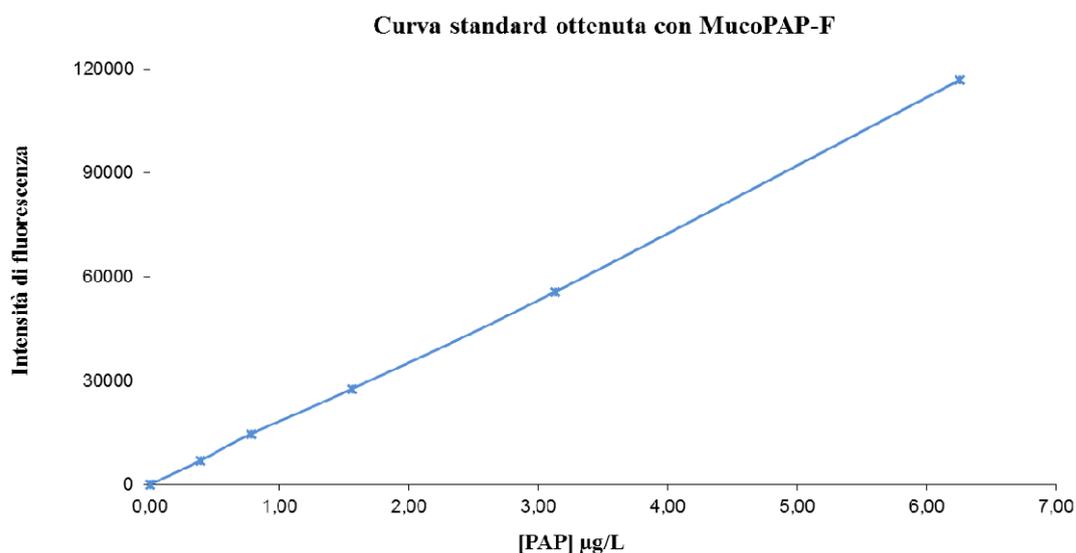
Nei neonati con un valore TIR elevato ($> 50 \mu\text{g/L}$), tutti i bambini con fibrosi cistica hanno una PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$ (ad eccezione delle forme frustrate e dei bambini con ileo da meconio). I neonati affetti rappresentano circa il 25% dei neonati con un valore TIR elevato e una PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$. Tra i neonati non affetti da questa patologia vi sono i prematuri, i bambini con sindrome di Down e quelli con gravi infezioni gastrointestinali (4, 7).

CARATTERISTICHE ANALITICHE

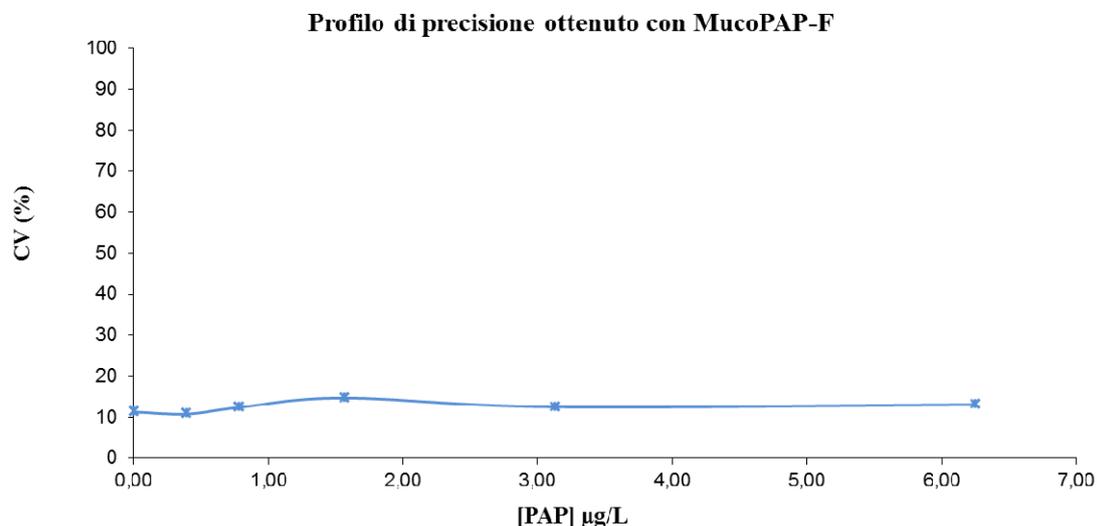
Tutti i dati presentati di seguito sono stati ottenuti con il dispositivo Fluostar Omega di BMG Labtech, le cui caratteristiche sono le seguenti

- Modalità di lettura: TRF (Time Resolved Fluorescence)
- Può essere ipersensibile,
- Filtro di eccitazione: 337 nm/ Filtro di emissione: 620 nm
- Integrazione: 60 μs
- Durata: 400 μs
- Tempo di pausa prima dell'avvio della riproduzione: 0,2 secondi
- Numero di flash per pozzetto: 200

Curva standard: una tipica curva standard per il dispositivo MucoPAP-F è mostrata nel grafico seguente. È stato definito utilizzando quattro diversi lotti e perforando i sei punti di intervallo nove volte per ogni lotto.



Profilo di accuratezza: il profilo di accuratezza del dispositivo MucoPAP-F è stato determinato utilizzando quattro diversi lotti e perforando i sei punti di intervallo per nove volte in ciascun lotto. È presentato nel grafico seguente.



Ripetibilità e riproducibilità: la ripetibilità e la riproducibilità del dispositivo MucoPAP-F sono state determinate utilizzando cinque diversi lotti di kit e punzonando undici volte ciascuno dei tre controlli interni forniti in ciascun kit. La ripetibilità rappresenta la variazione intra-lotto (n = 11) e la riproducibilità la variazione inter-lotto (n = 5).

Valore di controllo previsto (µg/L)	Valore ottenuto (µg/L)	Ripetibilità (CV in %)	Riproducibilità (CV in %)
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Limiti di rilevazione e di quantificazione: i limiti di rilevazione e di quantificazione del test MucoPAP-F (espressi come microgrammi di PAP per litro di sangue) sono rispettivamente 0,24 µg/L e 0,32 µg/L, assumendo che :

- il limite di rilevazione è definito come 3 deviazioni standard al di sopra della media delle misurazioni standard di zero
- Il limite di quantificazione è definito come 10 deviazioni standard sopra la media delle misure standard di zero.

Reazione crociata: nel test MucoPAP-F non è stata ottenuta alcuna reazione crociata con le proteine IL2, IL6, IFN, TNF ed *Escherichia coli*.

Effetto uncino: nessun effetto uncino fino alla concentrazione di PAP di 1000 µg/L, espressa in microgrammi di PAP per litro di sangue.

GARANZIA

Eventuali cambiamenti o modifiche alla procedura raccomandata dal produttore possono influenzare i risultati. In questo caso, Dynabio S.A. declina qualsiasi responsabilità, espressa, implicita o stabilita dalla legge, compresa la responsabilità derivante dalla vendita o dal trasporto del prodotto per il suo utilizzo. In questo caso, Dynabio S.A. non sarà responsabile di alcun danno diretto o indiretto che ne derivi.

RIFERIMENTI

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 Cyst Fibros 2016;15:752-758.

SINTESI DEL DOSAGGIO

Ricordarsi di preparare gli eluati degli spot di sangue in 150 μ L di PBS/pozzetto, il giorno prima del test in una piastra a fondo arrotondato (non fornita nel kit)

1. Portare le piastre di dosaggio e di eluizione a temperatura ambiente.
2. Dopo l'equilibratura a temperatura ambiente, rimuovere la piastra dal suo alloggiamento e aggiungere gli eluati dei range spot, dei tre controlli e dei campioni (100 μ L/pozzetto) dopo l'omogeneizzazione.
3. Incubare per 3 ore a temperatura ambiente sotto agitazione (orbitale a 300 rpm).
4. Terminare la preparazione del tampone di lavaggio (aggiungere Tween al PBS preparato il giorno prima).
5. Al termine delle 3 ore di incubazione, eseguire 5 lavaggi con PBS/Tween, svuotare la piastra e asciugarla.
6. Dispensare l'anticorpo biotinilato (100 μ L/pozzetto).
7. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente con agitazione (orbitale a 300 rpm).
8. Eseguire 5 lavaggi con PBS/Tween, svuotare la piastra e asciugarla.
9. Dispensare il coniugato streptavidina-europio (100 μ L/pozzetto).
10. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente con agitazione (orbitale a 300 rpm).
11. Eseguire 5 lavaggi con PBS/Tween, svuotare la piastra e asciugarla.
12. Dispensare la soluzione di sviluppo (200 μ L/pozzetto).
13. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente con agitazione (orbitale a 300 rpm).
14. Leggere la fluorescenza a 620 nm dopo l'eccitazione a 337 nm.

NOTE