



IFU-MPK03-PT
Versão 10
Última revisão: 2022/05

MucoPAP-F

Kit de teste PAP para rastreio de fibrose cística em recém-nascidos

Patente INSERM

Fluoroimunoensaio de tempo resolvido

Instruções de utilização e reagentes para 96 ensaios

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.com

REF MPK03

IVD

CE

SÍMBOLOS



Para uso diagnóstico *in vitro*



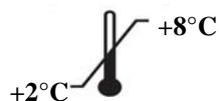
Número do lote



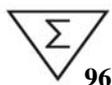
Número de catálogo



Data de expiração (aaaa/mm/dd)



Armazenar entre +2°C e +8°C



Contém reagentes para 96 ensaios



Nota: Leia as instruções de utilização



Fabricante

SÍNTESE

INTRODUÇÃO	4
PRINCÍPIO DA DOSAGEM.....	4
EQUIPAMENTO E PRODUTOS NÃO FORNECIDOS NECESSÁRIOS PARA A DOSAGEM.....	4
COMPOSIÇÃO DO KIT	5
DESCRIÇÃO DOS REAGENTES.....	6
COLEÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRA	6
AVISOS E PRECAUÇÕES	7
RECOMENDAÇÕES DE UTILIZAÇÃO.....	7
PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS E PADRÕES	8
PREPARAÇÃO DE REAGENTES	8
REALIZAR A DOSAGEM.....	8
CÁLCULO DOS RESULTADOS	9
Calibração	9
Controlo de qualidade	10
Análise dos resultados das amostras neonatais.....	10
LIMITAÇÕES DE DOSAGEM	10
INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	11
DESEMPENHO	11
CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.....	11
GARANTIA	12
REFERÊNCIAS.....	13
RESUMO DA DOSAGEM	13

INTRODUÇÃO

A proteína associada ao pancreatite (PAP, também conhecida como Reg3A) é sintetizada pelo pâncreas durante o sofrimento pancreático. Na fibrose cística, o pâncreas já é afectado *no útero* e produz PAP. Vários estudos demonstraram que a concentração de PAP é elevada no sangue dos recém-nascidos afectados (1, 2, 3, 4, 5).

O ensaio PAP nos cartões de rastreio calibrados pode, portanto, identificar recém-nascidos susceptíveis de terem fibrose cística.

PRINCÍPIO DA DOSAGEM

O kit MucoPAP-F destina-se à determinação quantitativa de PAP em amostras de sangue neonatal depositadas em cartões de rastreio calibrados e aprovados. É um imunoenensaio em sanduíche utilizando a técnica da Fluorescência Resolvida no Tempo (TRF). A gama de referência do ensaio e os controlos internos são apresentados como manchas de sangue em cartões de rastreio calibrados, tal como as amostras a serem testadas.

Os poços da placa de microtitulação são revestidos com anticorpos anti-PAP. Os eluatos das manchas de sangue são depositados nos poços e o PAP neles contido liga-se aos anticorpos específicos. As proteínas que não se ligam são removidas por lavagem. Os anticorpos anti-PAP marcados com biotina são então adicionados aos poços e ligam-se ao PAP imobilizado. Após a lavagem, o complexo antigénio-anticorpo é detectado por um complexo estreptavidina-europium. Após um novo passo de lavagem, a adição de uma solução de desenvolvimento de fluorescência faz com que a ligação entre estreptavidina e európio se quebre e o európio libertado seja capturado em quelatos altamente fluorescentes. Estes quelatos emitem a 620 nm após excitação a 337 nm. A intensidade de fluorescência emitida é proporcional à quantidade de PAP contida no eluato inicial.

EQUIPAMENTO E PRODUTOS NÃO FORNECIDOS NECESSÁRIOS PARA A DOSAGEM

Material:

- Agitador de vórtice
- Agitador de placas (orbital / 300 rpm = rotações por minuto)
- Lavador de placas (automático ou semi-automático)
- Espectrofluorómetro para microplacas, equipado com um filtro de 337 nm para excitação e um filtro de 620 nm para emissão
- Computador acoplado ao leitor para análise dos resultados
- Micropipetas automáticas monocanal e multi-canal
- Contentor de 1 litro (para tampão de lavagem)
- Punção manual ou automática para cortar discos de papel de filtro com um diâmetro de 3 mm
- Dois litros de água destilada

Equipamento de utilização única :

- Placa de fundo redondo de 96 poços (para eluição da mancha de sangue)
- Dicas para micropipetas
- 10 mL pipetas de plástico
- Quatro recipientes descartáveis de reagentes de anotar (um por reagente): PBS, anticorpos biotinylated, streptavidin-europium e solução de revelação
- Manchas de sangue recém-nascido em cartões de rastreio calibrados e aprovados pela autoridade

COMPOSIÇÃO DO KIT

Cada kit contém reagentes para 96 ensaios. A data de validade é impressa em todas as etiquetas dos kits.

A placa de microtitulação é apresentada em tiras removíveis, permitindo que o ensaio seja adaptado ao número de amostras a serem ensaiadas. No entanto, cada ensaio deve incluir um intervalo de referência e controles internos.

REAGENTES	CONSERVAÇÃO ANTES DA ABERTURA	CARACTERÍSTICAS UTILIZAÇÃO	CONSERVAÇÃO APÓS A ABERTURA
Placa de microtitulação (96 poços em tiras horizontais de 8 x 12 poços)	Armazenar no escuro na sua embalagem original entre +2°C e +8°C até à data de expiração.	Revestido com anticorpos anti-PAP. Pronto a usar.	Armazenar a +2°C a +8°C, nas saquetas dessecadas fornecidas, por um período até 30 dias.
Gama de referência de PAP		Manchas de sangue em papel de filtro calibrado a serem perfuradas e eluídas em 150 µL de PBS durante a noite (16h) a +2°C a +8°C.	
Controlos internos			
Anticorpos biotinylated anti-PAP	Estável entre +2°C e +8°C até à data de expiração.	Liofilizado a ser tomado suavemente em 11 mL de água destilada, directamente para o frasco.	Armazenar a -20°C por até 30 dias.
Tampão de diluição conjugada		Garrafa de 15 mL. Utilização para diluir o conjugado estreptavidina-europium 1:1000.	Armazenar entre +2°C e +8°C durante um máximo de 30 dias.
Conjugado Streptavidin-europium		Diluir 1:1000 em Tampão de Diluição Conjugado. Preparar extemporaneamente o volume necessário.	Não armazenar a diluição 1:1000 feita em tampão de diluição.
Solução de desenvolvimento de fluorescência (solução de divulgação)		2 ampolas de 11 mL cada. Pronto a usar.	Armazenar entre +2°C e +8°C durante um máximo de 30 dias.
PBS comprimido		Dissolver em 1 L de água destilada. Reservar 20 mL para a eluição das manchas de sangue.	Armazenar o tampão de lavagem preparado a -20°C por até 30 dias.
Solução Tween 20		Adicionar aos restantes 980 mL de PBS para fazer o tampão de lavagem.	

Nestas condições, o kit pode ser utilizado no prazo de 30 dias após a abertura.

Tal como fornecido pela Dynabio S.A., o kit de ensaio MucoPAP-F não é automatizado.

DESCRIÇÃO DOS REAGENTES

REAGENTES	DESCRIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DO INGREDIENTE ACTIVO
Placa de microtitulação (96 poços em tiras horizontais de 8 x 12 poços)	Poços revestidos com anticorpos monoclonais de rato especificamente dirigidos contra o PAP	4 µg/mL
Gama de referência de PAP	Papel de filtro contendo 2 conjuntos de 6 manchas de sangue secas complementadas com PAP	0 µg PAP/L de sangue 0,39 µg PAP/L de sangue 0,78 µg PAP/L de sangue 1,56 µg PAP/L de sangue 3,13 µg PAP/L de sangue 6,25 µg PAP/L de sangue
Controlos internos	Papel de filtro contendo 2 conjuntos de 3 manchas de sangue seco complementados com PAP	Low: 1 µg PAP/L de sangue Medium: 2 µg PAP/L de sangue High: 3 µg PAP/L de sangue
Anticorpos biotinylated anti-PAP	Anticorpos monoclonais de rato específicos para PAP, acoplado à biotina, em tampão fosfato contendo agentes protectores	0,25 µg/mL
Tampão de diluição conjugada	Solução salina à base de tampão Tris-HCl contendo proteínas bovinas, detergente e agente antibacteriano	/
Conjugado Streptavidin-europium	Europium-streptavidin complex, em solução salina tampão Tris-HCl contendo agentes protectores e antibacterianos	0,1 mg/mL
Solução de desenvolvimento de fluorescência	Solução contendo ácido acético, detergente e quelantes	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
PBS comprimido	Tampão de fosfato salino	/
Tween 20	Solução concentrada de detergente	10%

COLEÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRA

As amostras de sangue devem ser colhidas por picada de calcanhar e colhidas directamente em papel de filtro aprovado (método de referência). Se a amostra não puder ser aplicada directamente no papel de filtro, não utilizar sangue colhido na presença de reagentes anticoagulantes quelantes europium (EDTA, citrato), o que irá afectar os resultados do ensaio.

O método e o dispositivo de amostragem completo devem estar em conformidade com os regulamentos.

Recomenda-se consultar os regulamentos relativos ao tipo de amostra necessária e o período apropriado para a recolha de amostras de acordo com o actual programa de rastreio de recém-nascidos. Este último também define o período de tempo para o teste PAP após a recolha de amostras.

Os resultados de um ensaio baseado em amostras de sangue seco estão directamente relacionados com os cuidados tomados na colheita, manuseamento, transferência e armazenamento das amostras. A documentação (6) descreve exactamente os métodos de colheita de amostras e técnicas aceitáveis para aplicar gotas ou alíquotas de sangue a papel de filtro normalizado. Também fornece instruções sobre o manuseamento, transporte e armazenamento adequados das amostras para garantir resultados de qualidade no rastreio de recém-nascidos.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este kit só deve ser utilizado para fins de diagnóstico *in vitro* por pessoal com formação específica e equipamento de protecção adequado.

Os doentes secos, as manchas de sangue e os anticorpos biotinylated contêm elementos sanguíneos de origem humana ou animal: devem ser considerados potencialmente infecciosos e tratados com as precauções necessárias para a protecção do utilizador.

Consultar a Ficha de Dados de Segurança do dispositivo para eliminação. Os resíduos devem ser eliminados de acordo com os regulamentos em vigor no país de utilização.

Não pipetar para a boca.

Não comer, beber ou fumar durante a manipulação.

Os seguintes reagentes podem ser tóxicos ou irritantes: PBS, tampão de diluição, conjugado estreptavidina-europium e solução de desenvolvimento de fluorescência. Evitar o contacto com pele, olhos e membranas mucosas. Em caso de contacto accidental, enxaguar abundantemente com água.

Qualquer incidente grave relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-membro em que o utilizador e/ou o doente está estabelecido

RECOMENDAÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Estabelecer um layout de placas a ser seguido cuidadosamente, definindo a ordem de deposição nos poços da gama, amostras em branco, controlo e neonate, para evitar a inversão dos socos.

Evitar a contaminação biológica ou química das amostras.

Não utilizar reagentes vencidos.

Não misturar reagentes de diferentes lotes.

Equilibrar todos os reagentes à temperatura ambiente (+19°C a +22°C) e agitar antes de usar.

Evitar a contaminação cruzada entre diferentes reagentes: utilizar um reservatório diferente para cada reagente (reservatórios não fornecidos).

Respeitar rigorosamente o tempo de incubação indicado para cada etapa.

As lavagens devem ser cuidadosamente realizadas para evitar um aumento do ruído de fundo.

Nunca deixe a placa secar, pois isso afectará a qualidade dos resultados.

O anticorpo liofilizado biotinilado deve ser preparado com pelo menos 10 minutos de antecedência para assegurar a completa dissolução e homogeneidade do reagente.

A solução que desenvolve a fluorescência é um reagente de laboratório térmico e deve ser armazenada entre +2°C e +8°C.

Em caso de danos no kit durante o transporte (frascos derramados e/ou partidos, sacos de alumínio re-insuflados), por favor contacte a Dynabio S.A. por e-mail para info@dynabio.com ou por telefone para +33 (0)4 86 94 85 04.

PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS E PADRÕES

Um dia antes da dosagem :

Dissolver o comprimido de PBS fornecido em 1 L de água destilada. Após a homogeneização completa, utilizar 20 mL para a eluição das manchas de sangue: os 980 mL restantes são armazenados a +2°C a +8°C até ao dia seguinte, o dia do ensaio, para preparar o tampão de lavagem.

Amostras a serem testadas : Recortar uma pastilha de 3 mm de diâmetro do cartão numa área onde o sangue tenha permeado completamente o cartão, sem sobrecarga ou deposição dupla. Colocar a almofada num poço de uma placa de fundo redondo de 96 poços (não fornecida no kit). Para obter um ensaio em duplicado, perfurar em 2 locais separados na mesma mancha de sangue. Acrescentar 150 µL de tampão PBS a cada poço. Eluir pelo menos 16 horas (durante a noite) a +2°C a +8°C.

Gama de referência: Tal como as amostras a serem dosadas, cortar um bloco de 3 mm de diâmetro dos cartões da gama, imperativamente na periferia do local. Os seis pontos de alcance devem ser perfurados em duplicado. Colocar cada bloco num poço de uma placa de fundo redondo de 96 poços (não fornecido no kit). Acrescentar 150 µL de tampão PBS por poço. Eluir durante pelo menos 16 horas (durante a noite) a +2°C a +8°C. São obtidos seis pontos de alcance: 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 e 0 µg/L.

Controlos internos: Tal como a gama, os três controlos internos devem ser puncionados em duplicado a partir do cartão calibrado fornecido no kit, imperativamente na periferia da mancha (almofadas de 3 mm de diâmetro). Colocar cada bloco num poço de uma placa de fundo redondo de 96 poços (não fornecido no kit). Acrescentar 150 µL de tampão PBS por poço. Eluir durante pelo menos 16 horas (durante a noite) a +2°C a +8°C. A concentração de PAP nos três controlos é de 1 µg/L (Low Control), 2 µg/L (Medium Control) e 3 µg/L (High Control), respectivamente.

PREPARAÇÃO DE REAGENTES

No dia do ensaio: Após esta incubação nocturna, todos os eluatos devem ser homogeneizados por aspiração e deslocamento quando os 100 µL a serem ensaiados são tomados. As pontas das micropipetas devem ser alteradas entre cada depósito de gama homogeneizada, controlo ou amostras de sangue neonatal.

Placa doseadora: A placa, sob vácuo, deve ser equilibrada à temperatura ambiente antes de ser retirada da sua embalagem de alumínio. Após a abertura, a placa deve ser identificada pelo utilizador para não confundir com outra placa processada no mesmo dia. Todas as tiras de cada placa devem também ser identificadas (A a H) para evitar a sua troca no caso de se separarem da sua moldura durante as etapas de lavagem.

Tampão de lavagem (PBS-0,1% Tween): Aos restantes PBS dissolvidos no dia anterior (980 mL), adicionar o conteúdo da garrafa de Tween 20 (10%) fornecida e misturar bem.

Anticorpos biotinylated : O liofilizado é suavemente absorvido em 11 mL de água destilada directamente para o frasco. Está pronto para utilização após dissolução total e homogeneização.

Tampão de diluição conjugado: após homogeneização, este tampão é utilizado para preparar a diluição 1:1000 de conjugado estreptavidina-europium (ver abaixo).

Conjugado Streptavidin-Europium (0,1 mg/mL): diluir este conjugado 1:1000 em tampão de diluição até uma concentração de 0,1 µg/mL. O volume de conjugado diluído a ser preparado depende do número de poços utilizados no dia. Esta diluição deve ser preparada extemporaneamente durante a incubação do anticorpo biotinelado nos poços.

Solução de desenvolvimento: pronta a usar após a homogeneização.

REALIZAR A DOSAGEM

Uma gama PAP é obtida após a eluição em PBS das seis concentrações padrão fornecidas no kit. Inclui soluções de concentração 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 e 0 µg/L, obtidas em duplicado.

Cada ponto de alcance, eluídos em duplicado, é depositado, após homogeneização, na placa de ensaio (100 µL/poço). As pontas das micropipetas devem ser alteradas entre cada ponto de alcance homogeneizado. Os dois poços que recebem 100 µL do ponto 0 µg/L serão utilizados para avaliar o fundo do ensaio.

Os eluatos das manchas neonatais e os eluatos dos controlos internos são adicionados em duplicado à placa de ensaio (100 µL/poço) após a homogeneização. As pontas das micropipetas devem ser alteradas entre cada controlo homogeneizado ou amostra neonatal.

Estes depósitos são incubados durante 3 horas à temperatura ambiente (+19°C a +22°C), sob agitação (orbital a 300 rpm), sendo a placa previamente coberta com um adesivo.

Os poços são então lavados 5 vezes, utilizando o tampão de lavagem PBS/Tween previamente preparado 0,1%:

- Aspirar o conteúdo dos poços,
- Encher cada poço com ~300 µL de tampão de lavagem
- Repetir estes dois primeiros passos 4 vezes,
- Após a última lavagem, remover o líquido residual invertendo vigorosamente a placa (numa pia ou recipiente de resíduos líquidos) e depois batendo-a numa toalha de papel.

NB: recomenda-se a utilização de uma máquina de lavar automática ou semi-automática.

A solução de anticorpos biotinelada é imediatamente aplicada (100 µL/poço) e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação (orbital a 300 rpm) e a placa coberta com adesivo.

A placa é lavada 5 vezes, como descrito acima.

A solução conjugada de Streptavidina-europium diluída a 0,1 µg/mL em tampão de diluição é imediatamente adicionada (100 µL/poço) e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação (orbital a 300 rpm) com a placa coberta com adesivo.

A placa é lavada 5 vezes, como descrito acima.

A solução reveladora é então adicionada (**200 µL/poço**). Não cobrir a placa com o adesivo, pois isto pode extinguir o sinal.

Após um mínimo de 30 minutos de incubação sob agitação (orbital a 300 rpm), a fluorescência é lida utilizando um espectrofluorómetro, por excitação a um comprimento de onda de 337 nm e medindo a emissão a 620 nm. Um sinal estável e preciso só pode ser garantido se a placa for lida pelo menos 30 minutos após a adição da solução reveladora.

NB: o tempo mínimo de incubação da solução de revelação proposta neste protocolo foi determinado num leitor Fluostar Omega (BMG Labtech): ver detalhes da configuração deste dispositivo em "CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS".

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Calibração

Deve ser utilizada uma curva padrão para cada ensaio realizado. Se o ensaio do dia consistir em várias placas, o intervalo deve ser colocado em cada placa.

Para obter esta curva, o fundo do ensaio deve primeiro ser calculado como a média dos valores obtidos para o branco (0 µg/L ponto) e depois subtraído dos resultados brutos obtidos para todos os pontos do intervalo.

Este fundo deve também ser subtraído do sinal de cada controlo e amostra replicada antes de se obter a média das duas réplicas.

Exemplo de resultados obtidos para um intervalo de referência com um fundo médio de 4125 contagens (dadas a título indicativo):

PAP (µg/L)	Fluorescência				Média
	Resposta 1	Resposta 2	Resposta 1 - ruído de fundo médio	Resposta 2 - ruído de fundo médio	
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 curva padrão é construída de acordo com a função $[PAP] = f(\text{intensidade de fluorescência média})$, fazendo corresponder a fluorescência média de cada ponto da gama à sua concentração teórica e aplicando a regressão linear. Recomenda-se a utilização de um programa de computador para calcular esta função a partir dos valores da gama de referência. A concentração de PAP nos eluatos das manchas (controles e amostras) é calculada utilizando a equação da curva assim construída.

Controlo de qualidade

Recomenda-se a utilização de controlos internos para assegurar a validade dos resultados. Os controlos devem ser tratados da mesma forma que as amostras. Três controlos correspondentes a concentrações crescentes de PAP (baixo, médio, alto) são fornecidos no kit. Estes controlos devem ser incluídos em cada ensaio: se o ensaio do dia consistir em várias placas, os controlos devem ser colocados em cada placa.

Recomenda-se que os controlos não se desviem em mais de +/-20% da sua concentração teórica:

Controlo - Concentração teórica	Limite baixo	Limite elevado
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

Os resultados das amostras só devem ser validados se os resultados do controlo para esse ensaio cumprirem os critérios de aceitabilidade.

Em caso de problemas recorrentes ou alteração do desempenho do ensaio, por favor contacte a Dynabio S.A. por e-mail para info@dynabio.com ou por telefone para +33 (0)4 86 94 85 04.

Análise dos resultados das amostras neonatais

Cálculo da concentração de PAP no sangue de recém-nascidos: Se o protocolo descrito acima for rigorosamente seguido e as amostras forem de caixas de rastreio calibradas, perfuradas com um diâmetro de 3 mm, a concentração de sangue PAP para cada recém-nascido é obtida directamente usando a equação da curva de gama $[PAP] = f(\text{intensidade média de fluorescência})$

LIMITAÇÕES DE DOSAGEM

As informações sobre o ensaio PAP obtidas com o kit MucoPAP-F devem ser utilizadas como complemento a outros ensaios e testes (por exemplo, ensaio IRT) realizados como parte do rastreio da fibrose cística. Deve ser interpretado à luz de outras informações clínicas disponíveis.

Condições que podem conduzir a resultados analíticos anormais:

- o cartão de teste não está saturado de sangue uniformemente,
- a amostra foi cortada demasiado perto da borda da área de amostragem,
- a amostra foi cortada no centro do local em vez da periferia,
- a amostra foi recolhida ou seca incorrectamente,
- a amostra tenha sido exposta ao calor ou humidade,
- o papelão está contaminado com matéria fecal.

A amostra de sangue não deve conter EDTA ou citrato que são quelantes de europium.

Ver também as secções "Avisos e Precauções" e "Recomendações de Utilização".

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A avaliação da concentração de PAP em manchas de sangue é utilizada para identificar uma população de recém-nascidos com elevado risco de fibrose cística. As estratégias actuais envolvem geralmente três passos. No primeiro passo, o tripsinogénio imunoreactivo (IRT) é ensaiado em todos os recém-nascidos. No segundo, o PAP é medido em recém-nascidos com TIR elevado. Em recém-nascidos com TIR e PAP elevados, um terceiro passo consiste ou num teste diagnóstico, o teste de suor, ou uma pesquisa de mutações no gene CFTR, possivelmente seguido de um teste de suor em recém-nascidos com estas mutações.

Uma revisão exaustiva do desempenho das estratégias actualmente em uso foi realizada pela Haute Autorité de Santé e publicada em 2015. Está disponível sob o título "*Place de la stratégie couplant les assays de la TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France*" no seguinte endereço

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

Recomenda-se que esta análise seja referida antes de implementar um rastreio de recém-nascidos para fibrose cística envolvendo um teste PAP.

DESEMPENHO

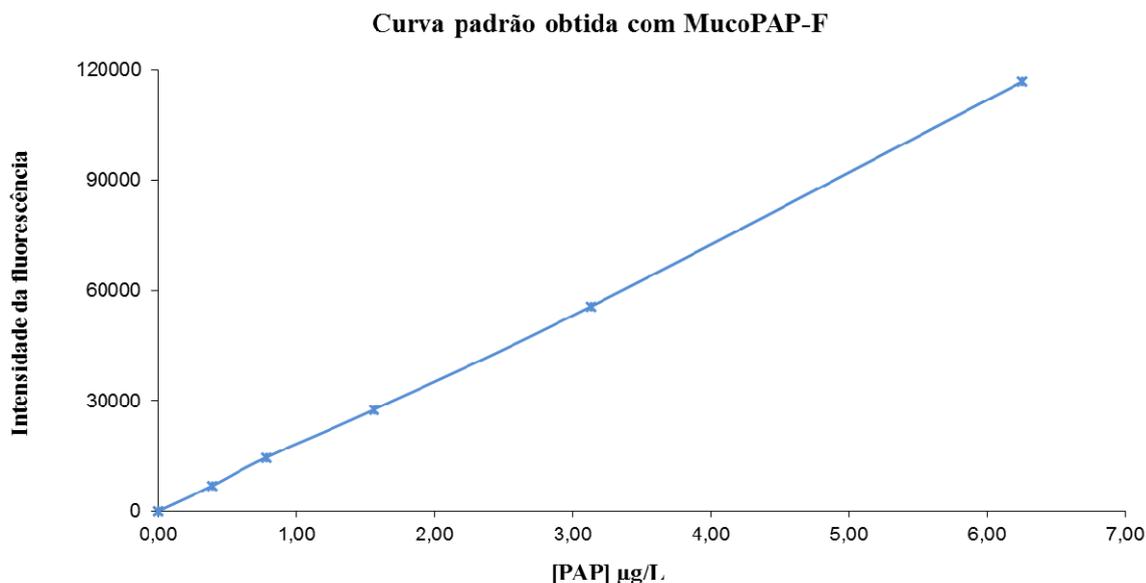
Em recém-nascidos com um valor TIR elevado ($> 50 \mu\text{g/L}$), todas as crianças com fibrose cística têm um PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$ (excepto para formas frustradas e bebés com íleo de mecónio). Os recém-nascidos afectados representam cerca de 25% dos recém-nascidos com um valor de IRT elevado e um PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$. Os recém-nascidos não afectados neste grupo incluem bebés prematuros, síndrome de Down e bebés com infecções GI graves (4, 7)

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

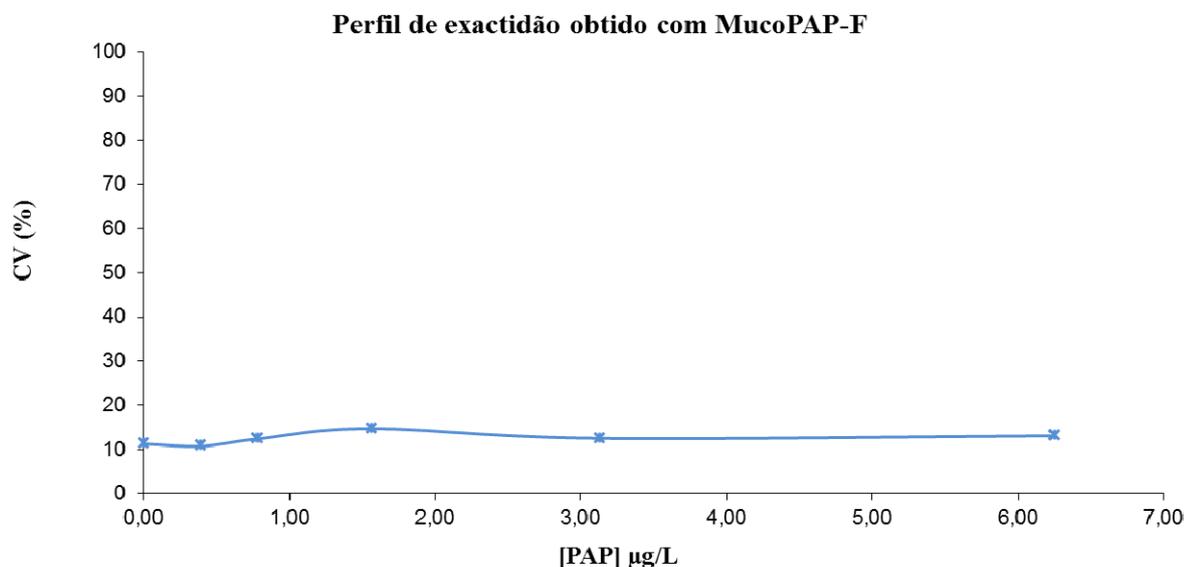
Todos os dados apresentados abaixo foram obtidos com o dispositivo Fluostar Omega da BMG Labtech, cujas características são as seguintes

- Modo de leitura: TRF (Time Resolved Fluorescence)
- Pode ser hiper-sensível,
- Filtro de excitação: 337 nm/ Filtro de emissão: 620 nm
- Integração: 60 μs
- Duração: 400 μs
- Tempo de pausa antes do início da reprodução: 0,2 segundos
- Número de flashes por poço: 200

Curva padrão: Uma curva padrão típica para o dispositivo MucoPAP-F é mostrada no gráfico abaixo. Foi definido utilizando quatro lotes diferentes e perfurando os seis pontos de alcance nove vezes em cada lote.



Perfil de precisão: O perfil de precisão do dispositivo MucoPAP-F foi determinado utilizando quatro lotes diferentes e perfurando os seis pontos de alcance nove vezes em cada lote. É apresentado no gráfico abaixo.



Repetibilidade e Reprodutibilidade: A repetibilidade e reprodutibilidade do dispositivo MucoPAP-F foi determinada utilizando cinco lotes de kits diferentes e perfurando onze vezes cada um dos três controlos internos fornecidos em cada kit. A repetibilidade representa a variação intra-lote (n = 11) e a reprodutibilidade representa a variação entre lotes (n = 5).

Valor de controlo esperado (µg/L)	Valor obtido (µg/L)	Repetibilidade (CV em %)	Reprodutibilidade (CV em %)
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Límites de detecção e quantificação: Os limites de detecção e quantificação do ensaio MucoPAP-F (expressos como microgramas de PAP por litro de sangue) são de 0,24 µg/L e 0,32 µg/L, respectivamente, assumindo que :

- o limite de detecção é definido como 3 desvios padrão acima da média das medições padrão zero
- o limite de quantificação é definido como 10 desvios padrão acima da média das medições padrão zero.

Reacção cruzada: No ensaio MucoPAP-F não foi obtida nenhuma reacção cruzada com as proteínas IL2, IL6, IFN, TNF e *Escherichia coli*.

Efeito gancho: Sem efeito gancho até à concentração de PAP de 1000 µg/L, expresso em microgramas de PAP por litro de sangue.

GARANTIA

Qualquer alteração ou modificação do procedimento recomendado pelo fabricante pode afectar os resultados. Neste caso, Dynabio S. A. Renuncia a qualquer responsabilidade, expressa, implícita ou estabelecida por lei, incluindo a responsabilidade decorrente da venda ou transporte do produto para a sua utilização. Neste caso, Dynabio S. A. não será responsável por quaisquer danos directos ou indirectos daí resultantes.

REFERÊNCIAS

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.

RESUMO DA DOSAGEM

Lembre-se de preparar os eluatos de mancha de sangue em 150 µL de PBS/bolo na véspera do ensaio numa placa de fundo redondo (não fornecida no kit)

1. Levar as placas de ensaio e de eluição à temperatura ambiente.
2. Após equilíbrio à temperatura ambiente, remover a placa de ensaio da sua caixa e adicionar os eluatos das manchas da gama, os três controlos e as amostras (100 µL/poço) após a homogeneização.
3. Incubar durante 3 horas à temperatura ambiente sob agitação (orbital a 300 rpm).
4. Acabar de preparar o tampão de lavagem (adicionar Tween ao PBS preparado no dia anterior).
5. No final da incubação de 3 horas, efectuar 5 lavagens PBS/Tween, esvaziar a placa, dar tapinhas a seco.
6. Dispensar anticorpos biotinylated (100 µL/poço).
7. Incubar durante 30 min à temperatura ambiente com agitação (orbital a 300 rpm).
8. Realizar 5 lavagens PBS/Tween, esvaziar a placa, dar tapinhas a seco.
9. Conjugado de estreptavidina-europium de dispersão (100 µL/ poço).
10. Incubar durante 30 min à temperatura ambiente com agitação (orbital a 300 rpm).
11. Realizar 5 lavagens PBS/Tween, esvaziar a placa, dar tapinhas a seco.
12. Dispensar a solução reveladora (200 µL/ poço).
13. Incubar durante 30 min à temperatura ambiente com agitação (orbital a 300 rpm).
14. Ler a fluorescência a 620 nm após excitação a 337 nm.

NOTAS