



IFU-MPK03-SL
Različica 11
Zadnji pregled: 2022/08

MucoPAP-F

Komplet za merjenje PAP za presejanje novorojenčkov za cistično fibrozo

Patent INSERM

Imunološko testiranje časovno ločljiva fluorescenca

Navodila za uporabo in reagenti za 96 testov

Izdelano s strani :

DYNABIO S.A.

Luminy Biotech Entreprises

Case 922 - 163, avenue de Luminy

13288 Marseille cedex 9

France

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

www.dynabio.eu

REF MPK03

IVD



SIMBOLI



Za in vitro diagnostično uporabo



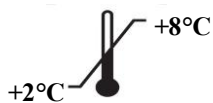
Številka serije



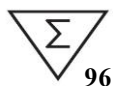
Kataloška številka



Datum izteka veljavnosti (rRRR/mm/dd)



Shranjujte med +2 °C in +8 °C



Vsebuje reagente za 96 testov



Opomba: preberite navodila za uporabo



Proizvajalec

VSEBINE

UVOD.....	4
NAČELO DOZIRANJA	4
OPREMA IN IZDELKI, KI NISO PRILOŽENI IN SO POTREBNI ZA DOZIRANJE.	4
SESTAVA KOMPLETA	5
OPIS REAGENTOV	6
ZBIRANJE IN OBDELAVA VZORCEV	6
OPOZORILA IN PREVIDNOSTNI UKREPI.....	7
PRIPOROČILA ZA UPORABO	7
PRIPRAVA VZORCEV IN STANDARDOV	7
PRIPRAVA REAGENTOV	8
IZVAJANJE TESTA	8
IZRAČUN REZULTATOV	9
Kalibracija.....	9
Nadzor kakovosti	9
Analiza rezultatov iz vzorcev novorojenčkov	10
OMEJITVE ODMERJANJA.....	10
RAZLAGA REZULTATOV	11
DELOVANJE	11
ANALITIČNE ZNAČILNOSTI	11
GARANCIJA	12
ODNOSI	13
POVZETEK ODMERJANJA.....	14

UVOD

Protein, povezan s pankreatitisom (PAP, znan tudi kot Reg3A), se sintetizira v trebušni slinavki med trpljenjem trebušne slinavke. Pri cistični fibrozi je trebušna slinavka prizadeta že v *maternici* in proizvaja PAP. Številne študije so pokazale, da je koncentracija PAP v krvi prizadetih novorojenčkov povišana (1, 2, 3, 4, 5).

Test PAP na umerjenih presejalnih karticah se zato lahko uporablja za prepoznavanje novorojenčkov, pri katerih obstaja verjetnost cistične fibroze.

NAČELO DOZIRANJA

Komplet MucoPAP-F je zasnovan za kvantitativno določanje PAP v vzorcih krvi novorojenčkov, shranjenih na umerjenih presejalnih karticah, ki so jih odobrili pristojni organi. Gre za sendvič imunoanalizo z uporabo tehnike časovno ločene fluorescence (Time Resolved Fluorescence - TRF). Referenčno območje testa in notranje kontrole so predstavljene v obliki krvnih madežev na kalibriranih presejalnih karticah, prav tako kot vzorci, ki jih je treba analizirati.

Vdolbinice mikrotitrne plošče so prevlečene s protitelesi anti-PAP. V vdolbinice se nanesejo eluati krvnih madežev in PAP, ki jih vsebujejo, se vežejo na specifična protitelesa. Proteini, ki se ne vežejo, se odstranijo s spiranjem. Nato v jamice dodamo protitelesa proti PAP, označena z biotinom, ki se vežejo na imobilizirane PAP. Po izpiranju se kompleks antigen-protitelo zazna s kompleksom streptavidin-evropij. Po nadaljnjem izpiranju dodatek raztopine ojačevalca fluorescence povzroči prekinitev vezi med streptavidinom in evropijem, sproščeni evropij pa se ujame v visoko fluorescentne kelate. Ti kelati po vzbujanju pri 337 nm sevajo pri 620 nm. Intenzivnost fluorescence je sorazmerna s količino PAP v začetnem eluatu.

OPREMA IN IZDELKI, KI NISO PRILOŽENI IN SO POTREBNI ZA DOZIRANJE.

Oprema:

- Mešalnik Vortex
- stresalnik plošč (orbitalni / 300 rpm = vrtljajev na minuto)
- Pranje plošč (avtomatsko ali polavtomatsko)
- Spektrofluorometer za mikroplošče, opremljen s 337 nm filtrom za vzbujanje in 620 nm filtrom za emisijo
- Računalnik, povezan z bralnikom za analizo rezultatov
- Samodejne eno- in večkanalne mikropipete
- 1 litrska posoda (za pufer za izpiranje)
- Ročni ali avtomatski luknjač za rezanje diskov iz filtrirnega papirja s premerom 3 mm
- Dva litra destilirane vode

Oprema za enkratno uporabo:

- 96-delna plošča z okroglim dnom (za elucija krvnih madežev)
- Nasveti za mikropipete
- 10 mL plastične pipete
- Štirje rezervoarji za enkratno uporabo za dodajanje reagentov (eden za vsak reagent): PBS, biotinizirani protitelesa, streptavidin-evropij in raztopina za razkrivanje
- Krvni madeži novorojenčkov na umerjenih presejalnih karticah, ki so jih odobrili pristojni organi

SESTAVA KOMPLETA

Vsak komplet vsebuje reagente za 96 testov. Datum izteka veljavnosti je natisnjen na vseh etiketah kompletov.

Mikrotitrna ploščica je predstavljena v obliki odstranljivih trakov, kar pomeni, da je mogoče preskus prilagoditi številu vzorcev, ki jih je treba določiti. Vendar pa mora vsak test vključevati referenčno območje in notranje kontrole.

REAKTIVIRA	OHRANJANJE PRED ODPRTJEM	FUNKCIJE UPORABA	OHRANJANJE PO ODPRTJE
Mikrotitrna ploščica (96 vdolbinic v vodoravnih trakvih 8 x 12 vdolbinic)	Hranite jih v temnem prostoru v originalni embalaži. med +2 °C in +8 °C do izteka roka uporabnosti.	Prekrit s protitelesci proti PAP. Pripravljen za uporabo.	V priloženih vrečkah z izsuševalnim sredstvom ga lahko shranjujete do 30 dni pri temperaturi med +2 °C in +8 °C.
Referenčni razpon PAP		Krvni madeži na kalibriranem filtrinem papirju, ki ga je treba preluknjati in eluirati v 150 µL PBS čez noč (16 ur) pri +2 °C do +8 °C.	
Notranji nadzor			
Biotinilirana protitelesa proti PAP	Stabilno med +2 °C in +8 °C do izteka roka uporabnosti.	Liofilizirano je treba previdno raztopiti v 11 mL destilirane vode, neposredno v vsebini vsebine.	Shranjujte pri -20 °C do 30 dni.
Pufr za redčenje konjugata		15 mL steklenička. Uporabite za redčenje konjugata streptavidin-evropij v razmerju 1:1000.	Shranjujte pri temperaturi med +2 °C in +8 °C do 30 dni.
Streptavidin-evropijev konjugat		Razredčite 1:1000 v pufru za redčenje konjugata. Pripravite potreben volumen naenkrat.	Razredčitve 1:1000, pripravljene v pufru za redčenje, ne shranjujte.
Raztopina za razvijanje fluorescence		2 viali po 11 mL. Pripravljen za uporabo.	Shranjujte pri temperaturi med +2 °C in +8 °C do 30 dni.
Tableta PBS		Raztopite v 1 litru destilirane vode. Odstavite 20 mL za elucijo krvnega madeža.	Pripravljeni pufer za izpiranje shranite pri -20 °C za največ 30 dni.
Raztopina Tween 20		Dodajte k preostalim 980 mL PBS, da dobite pufersko raztopino za izpiranje.	

Pod temi pogoji lahko komplet uporabite v 30 dneh po odprtju.

Testni komplet MucoPAP-F, ki ga je dobavila družba Dynabio S.A., ni avtomatiziran.

OPIS REAGENTOV

REAKTIVIRA	OPIS	KONCENTRACIJA AKTIVNE SESTAVINE
Mikrotitrna ploščica (96 vdolbinic v vodoravnih trakovih 8 x 12 vdolbinic)	Jamice, prevlečene z mišjimi monoklonskimi protitelesi, specifično usmerjenimi proti PAP	4 µg/mL
Referenčno območje PAP	Filtrini papir, ki vsebuje 2 kompleta 6 lis za sušene krvi dopolnjen s PAP	0 µg PAP/L krvi 0,39 µg PAP/L krvi 0,78 µg PAP/L krvi 1,56 µg PAP/L krvi 3,13 µg PAP/L krvi 6,25 µg PAP/L krvi
Notranji nadzor	Filtrini papir, ki vsebuje 2 kompleta 3 pike posušene krvi, dopolnjene s PAP	Low: 1 µg PAP/L krvi Medium: 2 µg PAP/L krvi High: 3 µg PAP/L krvi
Biotinilirana protitelesa proti PAP	Miška monoklonska protitelesa, specifična za PAP, vezan na biotin, v fosfatnem pufru ki vsebujejo zaščitna sredstva	0,25 µg/mL
Pufr za redčenje konjugata	Fiziološka raztopina na osnovi pufru Tris-HCl, ki vsebuje goveje beljakovine, detergent in antibakterijsko sredstvo	/
Streptavidin-evropijev konjugat	kompleks evropij-streptavidin v fiziološki raztopini na osnovi pufru Tris-HCl, ki vsebuje zaščitna in antibakterijska sredstva	0,1 mg/mL
Raztopina za razvijanje fluorescence	Raztopina, ki vsebuje očetno kislino, detergent in kelatna sredstva	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
Tableta PBS	Fiziološka raztopina fosfatnega pufru	/
Tween 20	Koncentrirana raztopina detergenta	10%

ZBIRANJE IN OBDELAVA VZORCEV

Vzorci krvi je treba odvzeti z vbodom v peto in neposredno na odobren filtrini papir (referenčna metoda). Če vzorca ni mogoče nanesti neposredno na filtrini papir, ne uporabljajte krvi, zbrane v prisotnosti antikoagulantnih reagentov, ki keltirajo evropij (EDTA, citrat), saj bi to vplivalo na rezultate testa.

Metoda in celotna naprava za vzorčenje morata biti v skladu s predpisi.

Priporočljivo se je posvetovati s predpisi o vrsti zahtevanega vzorca in ustreznem obdobju za odvzem vzorca glede na veljavni program presejanja novorojenčkov. Ta določa tudi, kako hitro po odvzemu vzorca je treba opraviti test PAP.

Rezultati, dobljeni s testom, ki temelji na vzorcih posušene krvi, so neposredno odvisni od previdnosti pri zbiranju, ravnanju, prenašanju in shranjevanju vzorcev. Dokumentacija (6) vsebuje podroben opis metod zbiranja vzorcev in sprejemljive tehnike nanašanja kapljic ali alikvotov krvi na standardiziran filtrini papir. Vsebuje tudi navodila o pravilnem ravnanju, prenosu in shranjevanju vzorcev za zagotavljanje kakovostnih rezultatov pri presejanju novorojenčkov.

OPOZORILA IN PREVIDNOSTNI UKREPI

Ta komplet sme uporabljati samo posebej usposobljeno osebje z ustrezno zaščitno opremo za namene diagnostike *in vitro*.

Posušene krvne lise bolnikov, razponov in kontrol ter biotinitirana protitelesa vsebujejo krvne elemente človeškega ali živalskega izvora: obravnavati jih je treba kot potencialno nalezljive in z njimi ravnati ob upoštevanju potrebnih previdnostnih ukrepov za zaščito uporabnika.

Navodila za odstranjevanje najdete v varnostnem listu naprave. Odpadke je treba odstraniti v skladu s predpisi, ki veljajo v državi uporabe.

Ne pipetirajte v usta.

Med rokovanjem ne jejte, ne pijte in ne kadite.

Naslednji reagenti so lahko strupeni ali dražilni: PBS, pufer za redčenje, streptavidin-evropski konjugat in raztopina za razvijanje fluorescence. Izogibajte se stiku s kožo, očmi in sluznicami. V primeru nenamernega stika temeljito sperite z vodo.

O vsakem resnem incidentu v zvezi s pripomočkom je treba obvestiti proizvajalca in pristojni organ države članice, v kateri ima uporabnik in/ali pacient sedež.

PRIPOROČILA ZA UPORABO

Sestavite diagram plošč, ki ga je treba dosledno upoštevati, in določite vrstni red, v katerem se v vdolbine nanesejo vzorci za razpon, kontrolni vzorec in vzorec novorojenčka, da se prepreči obračanje luknjic.

Izogibajte se biološki ali kemični kontaminaciji vzorcev.

Ne uporabljajte reagentov s pretečenim rokom uporabe.

Ne mešajte reagentov iz različnih serij.

Pred uporabo vse reagente izenačite na sobno temperaturo (+19 °C do +22 °C) in jih pretresite.

Izogibajte se navzkrižni kontaminaciji med različnimi reagenti: za vsak reagent uporabite drug rezervoar (rezervoarji niso priloženi).

Strogo upoštevajte čas inkubacije, ki je naveden za vsak korak.

Pranje je treba izvajati previdno, da se ne poveča hrup v ozadju.

Nikoli ne dovolite, da se plošča posuši, saj to vpliva na kakovost rezultatov.

Liofilizirano biotinitirano protitelo je treba pripraviti vsaj 10 minut prej, da se zagotovi popolno raztapljanje in homogenost reagenta.

Raztopina za razvijanje fluorescence je toplotno nestabilen reagent in jo je treba hraniti med +2 °C in +8 °C.

V primeru poškodb kompleta med prevozom (prevrnjene steklenice in/ali zlomljene, ponovno napolnjene aluminijaste vrečke) se obrnite na družbo Dynabio S.A. po elektronski pošti na_naslov_info@dynabio.eu ali po telefonu +33 (0)4 86 94 85 04.

PRIPRAVA VZORCEV IN STANDARDOV

Dan pred odmerjanjem:

Raztopite priloženo tableto PBS v 1 L destilirane vode. Po popolni homogenizaciji uporabite 20 mL za elucijo krvnih lis: preostalih 980 mL shranite pri temperaturi +2 °C do +8 °C do naslednjega dne, tj. do dneva analize, za pripravo pufrja za izpiranje.

Vzorci za merjenje: Iz kartona izrežite košček s premerom 3 mm na obrobju krvnega madeža, na območju, kjer je kri popolnoma prepojila karton, brez preobremenitve ali dvojnega nanosa. Ploščico položite v vdolbino 96-delne plošče z

okroglim dnom (ni priložena v kompletu). Če želite pridobiti dvojno analizo, vbodite na dveh ločenih mestih na istem krvnem madežu. V vsako vdolbinico dodajte 150 μ L pufru PBS. Eluirajo se vsaj 16 ur (čez noč) pri +2 °C do +8 °C.

Referenčno območje: Na enak način kot za vzorce, ki jih je treba dozirati, izrežite disk s premerom 3 mm s kartic za referenčno območje po obodu madeža. Šest točk območja je treba dvakrat preluknjati. Vsako kroglico položite v vdolbinico 96-delne plošče z okroglim dnom (ni priložena v kompletu). Dodajte 150 μ L pufru PBS na vdolbinico. Eluirajo se vsaj 16 ur (čez noč) pri +2 °C do +8 °C. Dobimo šest razponov: 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 in 0 μ g/L.

Notranje kontrole: Tako kot razpon je treba tudi tri notranje kontrole v dvojniku vbiti s kalibrirane kartice, ki je priložena v kompletu, na obrobju madeža (pelete s premerom 3 mm). Vsako peletu položite v vdolbino 96-delne plošče z okroglim dnom (ni priložena v kompletu). Dodajte 150 μ L pufru PBS na vdolbinico. Eluirajte vsaj 16 ur (čez noč) pri +2 °C do +8 °C. Koncentracija PAP v treh kontrolah je 1 μ g/L (Low control), 2 μ g/L (Medium control) in 3 μ g/L (High control).

PRIPRAVA REAGENTOV

Dan analize: Po inkubaciji čez noč je treba vse eluate homogenizirati s sesanjem in refluks med odvzemom 100 μ L za merjenje. Konice mikropipet je treba obvezno zamenjati med vsakim odvzemom homogeniziranega vzorca iz serije, kontrolnega vzorca ali krvi novorojenčkov.

Dozirna plošča: Vakuumska plošča mora biti uravnovežena pri sobni temperaturi, preden jo vzamete iz aluminijaste embalaže. Po odprtju mora uporabnik ploščico identificirati, da je ne bi zamenjal z drugo ploščico, ki je bila obdelana isti dan. Prav tako je treba identificirati vse trakove na vsaki ploščici (od A do H), da se prepreči njihova zamenjava, če se med pranjem ločijo od okvirja.

Raztopina za izpiranje (PBS-0,1 % Tween): V preostali PBS, raztopljen prejšnji dan (980 mL), dodajte vsebino priložene stekleničke Tween 20 (10 %) in dobro premešajte.

Biotinilirana protitelesa : Liofilizat se nežno vzame v 11 mL destilirane vode neposredno v vialo. Po popolnem raztapljanju in homogenizaciji je pripravljen za uporabo.

Raztopina za redčenje konjugata: po homogenizaciji se ta raztopina uporabi za pripravo konjugata streptavidin-evropij v razredčitvi 1/1000 (glej spodaj).

Konjugat streptavidin-evropij (0,1 mg/mL): konjugat razredčite v razmerju 1:1000 v pufru za redčenje, da dobite koncentracijo 0,1 μ g/mL. Količina razredčenega konjugata, ki ga je treba pripraviti, je odvisna od števila vdolbinic, ki se uporabljajo tisti dan. To razredčitev je treba pripraviti sproti, med inkubacijo biotiniliranega protitelesa v vdolbinicah.

Raztopina razvijalca: pripravljena za uporabo po homogenizaciji.

IZVAJANJE TESTA

Po eluciji šestih standardnih koncentracij, ki so priložene kompletu, v PBS se dobi niz PAP. Vključuje raztopine koncentracij 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 in 0 μ g/L, dobljene v dvojniku.

Vsaka točka razpona, eluiranja v dvojniku, se po homogenizaciji nanese na dozimo ploščo (100 μ L/jamico). Konice mikropipet je treba med nanosom vsake homogenizirane točke razpona obvezno zamenjati. V dve jamici, ki bosta prejeli 100 μ L točke 0 μ g/L, se oceni ozadje merjenja.

Eluati madežev vzorcev novorojenčkov in eluati notranjih kontrol se po homogenizaciji nanesejo v dvojniku na dozimo ploščo (100 μ L/jamico). Konice mikropipet je treba med vsakim nanosom homogeniziranih kontrolnih točk ali vzorcev novorojenčkov nujno zamenjati.

Te kapljice se inkubirajo 3 ure pri sobni temperaturi (+19 °C do +22 °C) ob mešanju (orbitalno pri 300 rpm), pri čemer je plošča predhodno prekrita z lepilnim trakom.

Vdolbinice nato petkrat speremo na naslednji način z uporabo predhodno pripravljenega 0,1-odstotnega PBS/Tween pufra za izpiranje:

- Vsebinsko vdolbinic odsesajte,
- Vsako vdolbinico napolnite s ~300 µL pufra za izpiranje
- Prva dva koraka ponovite štirikrat,
- Po zadnjem pranju odstranite preostalo tekočino tako, da ploščo močno obrnete (v umivalnik ali posodo za tekoče odpadke) in jo nato tapkate na vpojni papir.

Opomba: priporoča se uporaba avtomatskega ali polavtomatskega pralnega stroja.

Takoj nanesemo raztopino biotiniziranega protitelesa (100 µL/vrtina) in inkubiramo 30 minut pri sobni temperaturi, stresamo (orbital pri 300 vrtljajih na minuto), ploščo pa prekrijemo z lepilom.

Ploščo petkrat speremo, kot je opisano zgoraj.

Raztopini konjugata streptavidin-evropij, razredčeni na 0,1 µg/mL v pufru za redčenje, smo takoj dodali (100 µL/vrtina) in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi ob mešanju (orbital pri 300 vrtljajih na minuto), pri čemer je bila plošča prekrita z lepilom.

Ploščo petkrat speremo, kot je opisano zgoraj.

Nato se doda razvijalna raztopina (**200 µL/vdolbinico**). Plošče ne prekrijte z lepilom, saj lahko to ugasne signal.

Po najmanj 30 minutah inkubacije ob mešanju (orbital pri 300 vrtljajih na minuto) fluorescenco odčitamo s spektrofotometrom, tako da vzbudimo valovno dolžino 337 nm in izmerimo emisijo pri 620 nm. Stabilen in natančen signal je mogoče zagotoviti le, če ploščo odčitamo vsaj 30 minut po dodatku razvijalne raztopine.

Opomba: najkrajši čas inkubacije za raztopino razvijalca, predlagan v tem protokolu, je bil določen na bralniku Fluostar Omega (BMG Labtech): glej podrobnosti o konfiguraciji te naprave v poglavju "ANALITIČNE ZNAČILNOSTI".

IZRAČUN REZULTATOV

Kalibracija

Standardna krivulja mora ustrezati vsakemu opravljenemu testu. Če dnevni test vključuje več plošč, je treba razpon postaviti na vsako ploščo.

Za pridobitev te krivulje je treba najprej izračunati ozadje testa, ki ustreza povprečju vrednosti, dobljenih za slepi preskus (točka 0 µg/L), nato pa ga odšteti od neobdelanih rezultatov, dobljenih za vse točke območja.

To ozadje je treba pred izračunom povprečja obeh ponovitev odšteti od signala vsake kontrolne ponovitve in vzorca.

Primer rezultatov, dobljenih za referenčno območje s povprečnim šumom ozadja 4125 števecv (podan kot prikaz):

PAP (µg/L)	Fluorescenca				
	Odgovor 1	Odgovor 2	Odgovor 1 - povprečni hrup ozadja	Odgovor 2 - povprečni hrup ozadja	Povprečje
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

Standardna krivulja je zgrajena v skladu s funkcijo $[PAP] = f(\text{povprečna intenzivnost fluorescence})$, tako da se povprečna fluorescenca vsake točke območja ujema s teoretično koncentracijo in uporabi linearna regresija. Priporoča se uporaba računalniškega programa za izračun te funkcije iz vrednosti referenčnega območja. Koncentracija PAP v eluatih (kontrola in vzorci) se izračuna z uporabo enačbe tako konstruirane krivulje.

Kontrola kakovosti

Za zagotovitev veljavnosti rezultatov je priporočljiva uporaba notranjih kontrol. Kontrole je treba obravnavati enako kot vzorce. V kompletu so na voljo tri kontrole, ki ustrezajo naraščajočim koncentracijam PAP (low, medium, high). Te

kontrole je treba vključiti v vsako analizo: če je dnevna analiza sestavljena iz več plošč, je treba kontrole namestiti na vsako ploščo.

Priporočljivo je, da kontrole ne odstopajo za več kot $\pm 20\%$ od svoje teoretične koncentracije:

Kontrola - teoretična koncentracija	Nizka meja	Visoka meja
Low - 1 $\mu\text{g/L}$	0,8 $\mu\text{g/L}$	1,2 $\mu\text{g/L}$
Medium - 2 $\mu\text{g/L}$	1,6 $\mu\text{g/L}$	2,4 $\mu\text{g/L}$
High - 3 $\mu\text{g/L}$	2,4 $\mu\text{g/L}$	3,6 $\mu\text{g/L}$

Rezultate vzorca je treba validirati le, če kontrolni rezultati za to preskušanje izpolnjujejo merila sprejemljivosti.

V primeru ponavljajoče se težave ali spremembe učinkovitosti testa se obrnite na družbo Dynabio S.A. po elektronski pošti na naslov info@dynabio.eu ali po telefonu +33 (0)4 86 94 85 04.

Analiza rezultatov iz vzorcev novorojenčkov

Izračun koncentracije PAP v krvi novorojenčkov: če se dosledno upošteva zgoraj opisani protokol in če vzorci prihajajo iz kalibriranih presejalnih škatlic, preluknjanih s premerom 3 mm, se koncentracija PAP v krvi vsakega novorojenčka določi neposredno z uporabo enačbe krivulje razpona $[\text{PAP}] = f(\text{povprečna intenzivnost fluorescence})$.

OMEJITVE ODMERJANJA

Informacije o testu PAP, pridobljene s kompletom MucoPAP-F, je treba uporabljati kot dopolnilo k drugim testom in analizam (npr. testu IRT), ki se izvajajo v okviru presejanja za cistično fibrozo. Razlagati ga je treba v luči drugih razpoložljivih kliničnih informacij.

Pogoji, ki lahko privedejo do nenormalnih analitičnih rezultatov :

- testna kartica ni enakomerno prepojena s krvjo,
- vzorec je bil odrezan preblizu roba območja vzorčenja,
- vzorec je bil odrezan na sredini pege in ne na njenem obrobju,
- vzorec ni bil pravilno odvzet ali posušen,
- je bil vzorec izpostavljen vročini ali vlagi,
- karton je onesnažen s fekalijami.

Vzorec krvi ne sme vsebovati EDTA ali citrata, ki sta kelatorja europija.

Preberite tudi poglavji "Opozorila in previdnostni ukrepi" in "Priporočila za uporabo".

RAZLAGA REZULTATOV

Ocenjevanje koncentracije PAP v krvnih madežih se uporablja za identifikacijo populacije novorojenčkov z visokim tveganjem za cistično fibrozo. Strategije, ki se trenutno uporabljajo, na splošno vključujejo tri stopnje. V prvi se imunoreaktivni tripsinogen (IRT) določi pri vseh novorojenčkih. V drugi fazi se pri novorojenčkih z visokim TIR izmeri PAP. Pri novorojenčkih s povišanim TIR in PAP se v tretji fazi opravi diagnostični test, potni test ali iskanje mutacij v genu CFTR, ki mu po možnosti sledi potni test pri novorojenčkih s temi mutacijami.

Francoski nacionalni organ za zdravje je opravil izčrpen pregled učinkovitosti trenutno uporabljenih strategij in ga objavil leta 2015. Na voljo je pod naslovom *"Place de la stratégie couplant les dosages de la TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France"* na naslednjem naslovu:

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

Priporočljivo je, da se na to analizo sklicujete pred izvedbo presejalnega testa za cistično fibrozo pri novorojenčkih, ki vključuje test PAP.

DELOVANJE

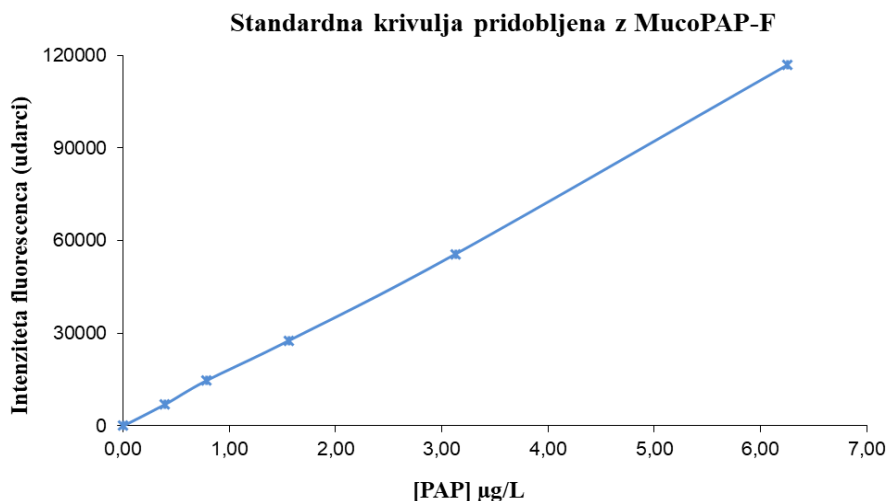
Pri novorojenčkih z visoko vrednostjo TIR ($> 50 \mu\text{g/L}$) imajo vsi otroci s cistično fibrozo PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$ (razen pri blagih nepopolnih oblikah in dojenčkih z meconialnim ileusom). Prizadeti novorojenčki predstavljajo približno 25 % novorojenčkov z visoko vrednostjo TIR in PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$. Neprizadeti novorojenčki v tej skupini vključujejo nedonošenčke, dojenčke z Downovim sindromom in dojenčke s hudimi okužbami prebavil (4, 7).

ANALITIČNE ZNAČILNOSTI

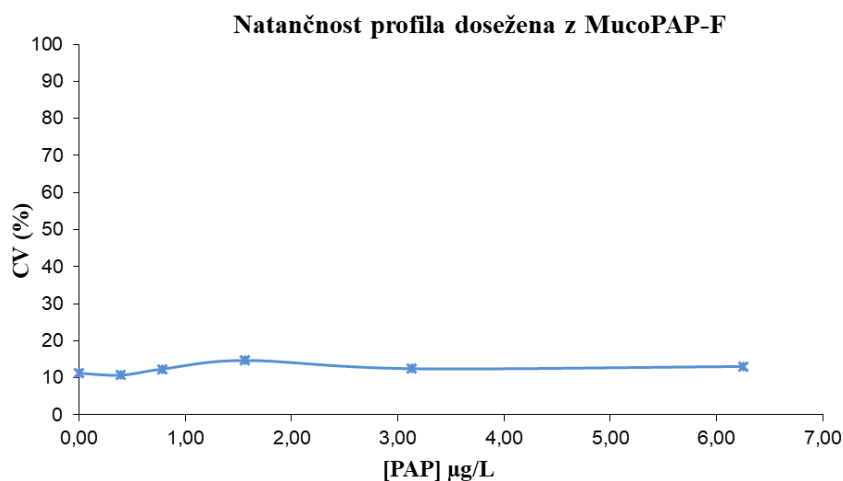
Vsi spodaj predstavljeni podatki so bili pridobljeni z napravo Fluostar Omega podjetja BMG Labtech, katere značilnosti so naslednje:

- Način branja: TRF (časovno ločljiva fluorescenca)
- Glava za branje hipersenzitivna,
- Excitacijski filter: 337 nm / Emisijski filter: 620 nm
- Integracija: 60 μs
- Trajanje: 400 μs
- Čas premora pred začetkom predvajanja: 0,2 sekunde
- Število bliskavic na vdolbino: 200

Standardna krivulja: Tipična standardna krivulja za napravo MucoPAP-F je prikazana na spodnjem grafu. Določena je bila z uporabo štirih različnih serij in devetkratnim prebijanjem šestih točk razpona v vsaki seriji.



Profil natančnosti: Profil natančnosti naprave MucoPAP-F je bil določen s štirimi različnimi serijami, pri čemer je bilo v vsaki seriji devetkrat prelučnanih šest točk razpona. Predstavljen je v spodnjem grafu.



Ponovljivost in obnovljivost: Ponovljivost in obnovljivost naprave MucoPAP-F sta bili določeni z uporabo petih različnih serij kompletov in z enajstkratnim luknjanjem vsake od treh notranjih kontrol, priloženih v vsakem kompletu. Ponovljivost predstavlja variacijo znotraj serije (n= 11), obnovljivost pa variacijo med serijami (n= 5).

Pričakovana kontrolna vrednost (µg/L)	Dobljena vrednost (µg/L)	Ponovljivost (CV %)	Reproduktibilnost (CV %)
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Meje detekcije in kvantifikacije: Meje detekcije in kvantifikacije testa MucoPAP-F (izražene v mikrogramih PAP na liter krvi) so 0,24 µg/L oziroma 0,32 µg/L ob predpostavki, da :

- meja zaznavnosti je opredeljena kot 3 standardni odkloni nad povprečjem ničelnih standardnih meritev
- meja kvantifikacije je opredeljena kot 10 standardnih odklonov nad povprečjem ničelnih standardnih meritev.

Navzkrižna reakcija: Test MucoPAP-F ni navzkrižno reagiral z beljakovinami IL2, IL6, IFN γ , TNF α ali *Escherichia coli*.

Učinek kavljia: Učinka kavljia ni bilo do koncentracije PAP 1000 µg/L, izražene v mikrogramih PAP na liter krvi.

GARANCIJA

Vsaka sprememba ali modifikacija postopka, ki ga priporoča proizvajalec, lahko vpliva na rezultate. V tem primeru družba Dynabio S.A. zavrača vso izraženo, implicitno ali zakonsko določeno odgovornost, vključno z odgovornostjo, ki izhaja iz prodaje ali prevoza za njegovo uporabo. V tem primeru družba Dynabio S.A. ni odgovorna za nobeno neposredno ali posredno škodo, ki bi iz tega izhajala.

ODNOSI

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.

POVZETEK DOZIRANJA

Ne pozabite pripraviti eluate krvnih madežev v 150 µL PBS/jamico dan pred doziranjem v ploščo z okroglim dnom (ni priložena v kompletu)

1. Plošče za doziranje in eluiranje postavite na sobno temperaturo.
2. Po izenačitvi temperature na sobno temperaturo vzemite ploščo za določanje iz embalaže in nanjo po homogenizaciji nanesite eluate madežev, treh kontrol in vzorcev (100 µL/jamico).
3. Inkubirajte 3 ure pri sobni temperaturi ob mešanju (orbitalno pri 300 rpm).
4. Dokončajte pripravo pralnega pufra (dodajte Tween v PBS, pripravljen dan prej).
5. Po 3 urah inkubacije opravite 5 pranj s PBS/Tween, izpraznite ploščo in jo osušite s tapkanjem.
6. Razporedite biotiniliran protiteleso (100 µL/jamico).
7. Inkubirajte 30 minut pri sobni temperaturi z mešanjem (orbitalno pri 300 rpm).
8. Opravite 5 pranj s PBS/Tweenom, izpraznite ploščo in jo osušite s tapkanjem.
9. Razporedite konjugat streptavidin-europij (100 µL/jamico).
10. Inkubirajte 30 minut pri sobni temperaturi ob mešanju (orbitalno pri 300 rpm).
11. Opravite 5 pranj s PBS/Tween, izpraznite ploščo in jo osušite s tapkanjem.
12. Razporedite raztopino za razkrivanje (200 µL/jamico).
13. Inkubirajte 30 minut pri sobni temperaturi ob mešanju (orbitalno pri 300 rpm).
14. Odčitajte fluorescenco pri 620 nm po vzbujanju pri 337 nm.

OPOMBE