



*IFU-MPK01-FR*  
*Version 10*  
*Dernière révision: 2022/05*

## **MucoPAP**

Trousse de dosage de la PAP pour le dépistage néonatal de la mucoviscidose

**Brevet INSERM**

### **Dosage immunoenzymatique**

Mode d'emploi et réactifs pour 96 dosages

Fabriqué par :

**DYNABIO S.A.,**

**Luminy Biotech Entreprises**

**Case 922 – 163, avenue de Luminy**

**13288 Marseille cedex 09**

**France**

**Tel : +33 (0)4 86 94 85 04**

**www.dynabio.com**

**REF** MPK01

**IVD**

**CE**

## SYMBOLES



Pour usage diagnostique *in vitro*



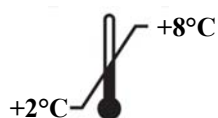
Numéro de lot



Numéro de catalogue



Date d'expiration (aaaa/mm/jj)



Stocker entre +2°C et +8°C



Contient des réactifs pour 96 dosages



Remarque : lire le mode d'emploi



Fabricant

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
<b>PRINCIPE DU DOSAGE .....</b>	<b>4</b>
<b>ÉQUIPEMENT ET PRODUITS NON FOURNIS NÉCESSAIRES AU DOSAGE .....</b>	<b>4</b>
<b>COMPOSITION DE LA TROUSSE .....</b>	<b>5</b>
<b>DESCRIPTION DES RÉACTIFS.....</b>	<b>6</b>
<b>PRÉLÈVEMENT ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS .....</b>	<b>6</b>
<b>MISE EN GARDE ET PRÉCAUTIONS.....</b>	<b>6</b>
<b>RECOMMANDATIONS D'USAGE .....</b>	<b>7</b>
<b>PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS .....</b>	<b>7</b>
<b>PRÉPARATION DES RÉACTIFS .....</b>	<b>8</b>
<b>RÉALISATION DU DOSAGE.....</b>	<b>8</b>
<b>CALCUL DES RÉSULTATS .....</b>	<b>9</b>
<b>Calibration .....</b>	<b>9</b>
<b>Contrôle qualité .....</b>	<b>10</b>
<b>Analyse des résultats des échantillons de nouveau-nés .....</b>	<b>10</b>
<b>LIMITATIONS DU DOSAGE .....</b>	<b>10</b>
<b>INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.....</b>	<b>11</b>
<b>PERFORMANCES.....</b>	<b>11</b>
<b>CARACTÉRISTIQUES ANALYTIQUES.....</b>	<b>11</b>
<b>GARANTIE.....</b>	<b>12</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>13</b>
<b>RÉSUMÉ DU DOSAGE.....</b>	<b>13</b>

## INTRODUCTION

La Protéine Associée à la Pancréatite (PAP, aussi nommée Reg3A) est synthétisée par le pancréas au cours de la souffrance pancréatique. En cas de mucoviscidose, le pancréas est déjà atteint *in utero* et produit de la PAP. Plusieurs études ont montré que la concentration en PAP était élevée dans le sang des nouveau-nés atteints (1, 2, 3, 4, 5).

Le dosage de PAP sur les cartons de dépistage calibrés permet donc d'identifier les nouveau-nés susceptibles d'être atteints de mucoviscidose.

## PRINCIPE DU DOSAGE

Le kit MucoPAP est destiné au dosage quantitatif de la PAP dans les échantillons de sang de nouveau-nés déposés sur les cartons de dépistage calibrés et approuvés par les autorités compétentes. Il s'agit d'un dosage immunologique de type sandwich utilisant une technique de révélation enzymatique (ELISA). La gamme de référence du dosage ainsi que le contrôle interne sont présentés sous forme lyophilisée, à reprendre dans de l'eau distillée et à diluer de façon à obtenir précisément les concentrations de PAP déterminées dans ce manuel.

Les puits de la plaque de microtitration sont revêtus d'anticorps anti-PAP. La gamme, le contrôle et les éluats des taches de sang des nouveau-nés sont déposés dans les puits et la PAP qu'ils contiennent se fixe sur les anticorps spécifiques. Les protéines qui ne sont pas fixées sont éliminées par lavages. Des anticorps anti-PAP marqués à la biotine sont ensuite déposés dans les puits et se fixent sur la PAP immobilisée. Après lavages, le complexe antigène-anticorps est détecté par un complexe avidine-peroxydase. Après une nouvelle étape de lavages, l'ajout d'un substrat chromogène de l'enzyme peroxydase entraîne l'apparition d'un produit coloré bleu. L'arrêt de la réaction enzymatique par ajout d'acide transforme la coloration bleue en jaune, mesurable par spectrophotométrie à 450 nm. L'intensité de la coloration émise est proportionnelle à la quantité de PAP contenue dans l'échantillon initial.

## ÉQUIPEMENT ET PRODUITS NON FOURNIS NÉCESSAIRES AU DOSAGE

### Matériel :

- Agitateur Vortex
- Laveur de plaques (automatique ou semi-automatique)
- Spectrophotomètre pour microplaques, équipé d'un filtre 450 nm (et éventuellement d'un filtre 630 nm pour soustraire l'intensité résiduelle de la coloration bleue à la densité optique mesurée à 450 nm)
- Ordinateur couplé au lecteur pour l'analyse des résultats
- Micropipettes automatiques mono- et multicanaux
- Contenant d'un litre (tampon de lavage)
- Emporte-pièce manuel ou automatique pour découper des disques de papier filtre d'un diamètre de 3 mm
- Deux litres d'eau distillée

### Matériel à usage unique :

- Plaque 96 puits à fond rond (pour l'élution des taches de sang)
- Pointes pour micropipettes
- Pipettes plastique de 10 mL
- Cinq réservoirs à réactif jetables à annoter (un par réactif) : PBS, anticorps biotinylés, avidine-peroxydase, substrat chromogène et acide
- Taches de sang de nouveau-nés sur cartons de dépistage calibrés et approuvés par les autorités compétentes

## COMPOSITION DE LA TROUSSE

Chaque trousse contient des réactifs pour 96 dosages. La date de péremption est inscrite sur toutes les étiquettes de la trousse.

La présentation de la plaque de microtitration sous forme de barrettes amovibles permet d'adapter le dosage au nombre d'échantillons à doser. Chaque dosage doit cependant inclure une gamme de référence et un contrôle interne.

RÉACTIFS	CONSERVATION AVANT OUVERTURE	CARACTÉRISTIQUES D'UTILISATION	CONSERVATION APRÈS OUVERTURE
Plaque de microtitration (96 puits en barrettes horizontales de 8 x 12 puits)	Conserver à l'abri de la lumière dans son emballage d'origine entre +2°C et +8°C jusqu'à la date de péremption.	Revêtue d'anticorps anti-PAP. Prête à l'emploi.	Conserver entre +2°C et +8°C, dans le sachet avec dessiccant fourni à cet effet, pendant 30 jours maximum.
Gamme de PAP de référence	Stable entre +2°C et +8°C jusqu'à la date de péremption.	Lyophilisat à reprendre délicatement dans 1 mL d'eau distillée, directement dans le tube.	Conserver à -20°C pendant 30 jours maximum.
Contrôle interne			
Tampon de dilution de la gamme de PAP de référence			
Anticorps anti-PAP biotinylés		Lyophilisat à reprendre délicatement dans 11 mL d'eau distillée, directement dans le flacon.	
Conjugué avidine-peroxydase			
Substrat chromogène (TMB)		Flacon de 15 mL prêt à l'emploi.	Conserver entre +2°C et +8°C pendant 30 jours maximum.
Acide (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )		Flacon de 11 mL prêt à l'emploi.	
Pastille de PBS		Dissoudre dans 1 L d'eau distillée. Réserver 15 mL pour l'éluion des taches de sang.	Conserver à -20°C le tampon de lavage préparé pendant 30 jours maximum.
Solution de Tween 20		Ajouter aux 985 mL de PBS restants pour obtenir le tampon de lavage.	

Dans ces conditions, la trousse peut être utilisée dans les 30 jours suivant son ouverture.

Telle que fournie par Dynabio, la trousse de dosage MucoPAP n'est pas automatisée.

## DESCRIPTION DES RÉACTIFS

RÉACTIFS	DESCRIPTION	CONCENTRATION DU PRINCIPE ACTIF
Plaque de microtitration (96 puits en barrettes horizontales de 8 x 12 puits)	Puits revêtus d'anticorps monoclonaux de souris dirigés spécifiquement contre la PAP	4 µg/mL
Gamme de PAP de référence	Protéine recombinante humaine PAP (rhPAP) en tampon phosphate contenant protéines bovines et agents protecteurs	0,5 µg/L de PAP
Contrôle interne	Protéine recombinante humaine PAP (rhPAP) en tampon phosphate contenant protéines bovines et agents protecteurs	0,02 µg/L de PAP
Anticorps anti-PAP biotinylés	Anticorps monoclonaux de souris spécifiques de la PAP, couplés à la biotine, en tampon phosphate contenant des agents protecteurs	0,25 µg/mL
Tampon de dilution de la gamme de référence	Solution saline à base de Tris-HCl contenant protéines bovines et agents protecteurs	/
Conjugué avidine-peroxydase	Avidine couplée à l'enzyme peroxydase, en tampon phosphate/citrate contenant des agents protecteurs	0,16 µg/mL
Substrat chromogène (TMB)	Solution de substrat chromogène de l'enzyme peroxydase 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB)	≤ 0.05%
Acide (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Solution d'acide sulfurique dilué	5,4%
Pastille de PBS	Tampon phosphate salin	/
Tween 20	Solution de détergent concentrée	10%

## PRÉLÈVEMENT ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de sang doivent être prélevés par piqûre au talon et collectés directement sur papier-filtre approuvé (méthode de référence).

La méthode et le dispositif complet de prélèvement des échantillons doivent satisfaire à la réglementation.

Il est recommandé de consulter la réglementation concernant le type d'échantillon requis et la période appropriée de recueil des échantillons selon le programme de dépistage néonatal en vigueur. Ce dernier définit également dans quel délai le dosage de la PAP doit être effectué après la collecte de l'échantillon.

Les résultats issus d'un dosage basé sur des échantillons de sang séché dépendent directement du soin apporté au prélèvement, à la manipulation, au transfert et à la conservation des échantillons. Une documentation (6) décrit avec précision les méthodes de collecte des échantillons et les techniques acceptables pour appliquer des gouttes ou aliquots de sang sur du papier-filtre standardisé. Elle fournit également les instructions sur la manipulation, le transport et la conservation corrects des échantillons pour garantir l'obtention de résultats de qualité dans le cadre d'un dépistage néonatal.

## MISE EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Cette trousse ne doit être utilisée qu'en usage diagnostique *in vitro*, par du personnel spécifiquement formé et disposant des équipements de protection adéquats.

Les taches de sang séché de patients ainsi que les anticorps biotinylés contiennent des éléments sanguins d'origine humaine ou animale, respectivement : ils doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés en prenant les précautions nécessaires à la protection de l'utilisateur.

Se référer à la Fiche de Données de Sécurité du dispositif en ce qui concerne son élimination. Les déchets devront être éliminés selon la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.

Ne pas pipeter à la bouche.

Ne pas manger, boire ou fumer pendant la manipulation.

Les réactifs suivants peuvent être toxiques ou irritants : PBS, substrat chromogène (TMB) et solution d'acide ( $H_2SO_4$ ). Éviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact accidentel, rincer abondamment à l'eau.

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif doit faire l'objet d'une notification auprès du fabricant et à l'autorité compétente de l'état membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

## **RECOMMANDATIONS D'USAGE**

Etablir un schéma de plaque à suivre scrupuleusement, définissant l'ordre de dépôt dans les puits des points de gamme, de blanc, de contrôles et d'échantillons de nouveau-nés, afin d'éviter une inversion.

Éviter toute contamination biologique ou chimique des échantillons.

Ne pas utiliser de réactifs périmés.

Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

Équilibrer tous les réactifs à température ambiante (entre  $+19^{\circ}C$  et  $+22^{\circ}C$ ) et les agiter avant emploi.

Éviter toute contamination croisée entre les différents réactifs: utiliser un réservoir différent pour chaque réactif (réservoirs non fournis).

Respecter strictement le temps d'incubation indiqué pour chacune des étapes.

Les lavages doivent être soigneusement exécutés pour éviter une augmentation du bruit de fond.

Ne jamais laisser la plaque sécher, ce qui altérerait la qualité des résultats.

Les réactifs lyophilisés (gamme standard, contrôle interne, tampon de dilution, anticorps biotinylés, avidine-peroxydase) doivent être préparés au moins 10 minutes à l'avance afin que leur dissolution soit totale et les réactifs homogènes.

Le substrat TMB ne doit pas être exposé à l'air et à la lumière avant son utilisation.

En cas d'endommagement de la trousse pendant le transport (flacons cassés et/ou renversés, sachet aluminium regonflé), merci de contacter Dynabio S.A. par courriel à [info@dynabio.com](mailto:info@dynabio.com) ou par téléphone au +33 (0)4 86 94 85 04.

## **PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS**

La veille du dosage :

Dissoudre la tablette de PBS fournie dans 1 L d'eau distillée. Après complète homogénéisation, utiliser 15 mL pour l'éluion des taches de sang : les 985 mL restants sont gardés entre  $+2^{\circ}C$  et  $+8^{\circ}C$  jusqu'au lendemain, jour du dosage, pour préparer le tampon de lavage.

*Échantillons à doser :* Découper dans les cartons une pastille de 3 mm de diamètre, impérativement en périphérie de la tache de sang, dans une région où le sang a complètement imprégné le carton, sans surcharge ni double-dépôt. Déposer la pastille dans un puits d'une plaque 96 puits à fond rond (non fournie dans le kit). Pour obtenir un dosage en double, poinçonner à deux endroits distincts sur une même tache de sang. Ajouter 150  $\mu$ L de tampon PBS dans chaque puits. Éluer au moins 16 heures (une nuit) entre  $+2^{\circ}C$  et  $+8^{\circ}C$ .

## PRÉPARATION DES RÉACTIFS

**Le jour du dosage :** Après cette incubation sur la nuit, tous les éluats doivent être homogénéisés par aspiration et refoulement lors du prélèvement des 100 µL à doser. Les pointes des micropipettes doivent impérativement être changées entre chaque dépôt d'échantillon homogénéisé de gamme, de contrôle ou de sang de nouveau-nés.

**Plaque de dosage :** La plaque, sous vide, doit être équilibrée à température ambiante avant de l'extraire de son emballage aluminium. Ne pas retirer la plaque de son emballage avant d'avoir terminé la préparation de toutes les dilutions de gamme et d'échantillons de patients. Après ouverture, la plaque doit être identifiée par l'utilisateur pour ne pas la confondre avec une autre plaque traitée le même jour. Toutes les barrettes de chaque plaque doivent également être identifiées (de A à H) pour éviter de les intervertir dans le cas où elles se détacheraient de leur cadre lors des étapes de lavage.

**Tampon de lavage (PBS-0,1% Tween) :** Ajouter au reste de PBS dissout la veille (985 mL) le contenu du flacon de Tween 20 (solution à 10 %) fourni et homogénéiser le mélange.

**Gamme standard de référence :** la gamme est préparée à partir de PAP recombinante humaine lyophilisée. Le lyophilisat est repris dans 1 mL d'eau distillée pour obtenir 0,5 µg/L de PAP. Cette solution standard à 0,5 µg/L de PAP est ensuite utilisée pour préparer une gamme de référence allant de 0,125 à 0,0078 µg/L, par dilutions successives dans le tampon de dilution fourni à cet effet.

**Contrôle interne :** le contrôle est également préparé à partir de PAP recombinante humaine lyophilisée. Le lyophilisat est repris dans 1 mL d'eau distillée pour obtenir 0,02 µg/L de PAP. Lors du calcul des résultats, ce contrôle est attendu à une concentration de  $0,02 \times 50 = 1$  µg/L. En effet, un facteur d'éluion ( $\times 50$ ) est appliqué aux échantillons de nouveau-nés du fait de l'éluion de la PAP en PBS (3 µL de sang dans le poinçon dilué dans 150 µL final de PBS). Pour simplifier le traitement des données par les logiciels d'analyse, ce même facteur est à appliquer au contrôle interne.

**Tampon de dilution :** Le lyophilisat est repris délicatement dans 11 mL d'eau distillée, directement dans le flacon. Il est utilisé après dissolution totale et homogénéisation pour préparer les dilutions de la gamme standard.

**Anticorps biotinylés :** Le lyophilisat est repris délicatement dans 11 mL d'eau distillée, directement dans le flacon. Il est prêt à l'emploi après dissolution totale et homogénéisation.

**Avidine-peroxydase :** Le lyophilisat est repris délicatement dans 11 mL d'eau distillée, directement dans le flacon. Il est prêt à l'emploi après dissolution totale et homogénéisation.

**Substrat chromogène (TMB) :** Solution liquide prête à l'emploi après homogénéisation.

**Acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>):** Solution liquide prête à l'emploi après homogénéisation.

## RÉALISATION DU DOSAGE

Une gamme de PAP de référence est préparée à partir de la solution standard de PAP lyophilisée, préalablement reconstituée à 0,5 µg/L dans 1 mL d'eau distillée. Le tampon de dilution fourni dans la trousse est utilisé pour préparer des dilutions successives de cette solution standard et obtenir les concentrations de PAP suivantes : 0,125 / 0,062 / 0,031 / 0,015 / 0,0078 µg/L. Chaque dilution de 0,125 à 0,0078 µg/L sera dosée en double à raison de 100 µL/puits.

**Préparation de la gamme de référence (exemple pour une gamme de PAP déposée en double) :**

150 µL de la solution standard à 0,5 µg/L + 450 µL de tampon de dilution = 0,125 µg/L

puis :

300 µL de la dilution à 0,125 µg/L + 300 µL de tampon de dilution = 0,062 µg/L

puis :

300 µL de la dilution à 0,062 µg/L + 300 µL de tampon de dilution = 0,031 µg/L

puis :

300 µL de la dilution à 0,031 µg/L + 300 µL de tampon de dilution = 0,015 µg/L

puis :

300 µL de la dilution à 0,015 µg/L + 300 µL de tampon de dilution = 0,0078 µg/L

Le bruit de fond (blanc correspondant à 0 µg/L de PAP) sera déterminé par dépôt de 100 µL/puits de tampon de dilution. Les pointes des micropipettes doivent impérativement être changées entre chaque dilution de la gamme.



La gamme, le blanc, le contrôle interne et les échantillons à doser sont déposés dans les puits (100 µL/puits). Les pointes des micropipettes doivent impérativement être changées entre chaque dépôt de point de contrôle ou d'échantillon de nouveau-nés homogénéisés.

La plaque est couverte d'un adhésif puis mise à incuber 3 heures à température ambiante (+19°C à +22°C).

Les puits sont ensuite lavés 5 fois comme suit, à l'aide du tampon de lavage PBS/Tween préalablement préparé :

- aspirer le contenu de la plaque,
- remplir chaque puits avec ~300 µL de tampon PBS/Tween
- répéter ces deux étapes 4 fois,
- après le dernier lavage, éliminer le liquide résiduel en inversant énergiquement la plaque (dans un évier ou un contenant à déchets liquides) puis en la tapotant sur un papier absorbant.

*NB : l'usage d'un laveur automatique ou semi-automatique est recommandé.*

La solution d'anticorps biotinylés est immédiatement déposée (100 µL/puits) et incubée 30 minutes à température ambiante, la plaque étant couverte d'un adhésif.

La plaque est lavée 5 fois comme décrit ci-dessus.

Le conjugué avidine-peroxydase est immédiatement ajouté (100 µL/puits) et incubé 15 minutes à température ambiante, la plaque étant couverte d'un adhésif.

La plaque est lavée 5 fois comme décrit ci-dessus.

Le substrat chromogène (TMB) est ensuite ajouté (100 µL/puits) et incubé 15 minutes à température ambiante en plaçant la plaque à l'obscurité, préalablement couverte d'un adhésif.

Après cette incubation de 15 minutes avec le TMB à l'abri de la lumière, une coloration bleue d'intensité variable apparaît dans les puits : sans effectuer de lavage, ajouter directement 100 µL/puits de la solution d'acide pour arrêter la réaction enzymatique. Cet ajout porte le volume total à 200 µL/puits et transforme la coloration bleue en jaune.

L'absorbance de chaque puits doit être lue dans les 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction à l'aide d'un spectrophotomètre équipé d'un filtre 450 nm.

*NB : Certains spectrophotomètres sont programmés pour lire une première fois à 450 nm puis une deuxième fois avec un filtre de référence à 630 nm. L'absorbance à 630 nm est ensuite soustraite de celle à 450 nm pour éliminer l'intensité résiduelle de la coloration bleue. Le filtre à 630 nm n'est cependant pas indispensable.*

## **CALCUL DES RÉSULTATS**

### **Calibration**

A chaque dosage réalisé doit correspondre une courbe standard. Si le dosage du jour comprend plusieurs plaques, la gamme devra être posée sur chaque plaque.

Pour obtenir cette courbe, il faut au préalable calculer le bruit de fond du dosage qui correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour le blanc (point à 0 µg/L), puis le soustraire aux résultats bruts obtenus pour l'ensemble des points de gamme.

Ce bruit de fond doit également être soustrait au signal de chaque réplicat de contrôle et d'échantillons avant de calculer la moyenne des deux réplicats.

Exemple de résultats obtenus pour une gamme de référence avec une moyenne de bruit de fond d'une densité optique de 0,075 (donné à titre indicatif) :

PAP (µg/L)	Absorbance (Densité Optique à 450nm)				Moyenne
	Réplikat 1	Réplikat 2	Réplikat 1 - moyenne bruit de fond	Réplikat 2 - moyenne bruit de fond	
0	0,076	0,074			
0,0078	0,318	0,300	0,243	0,225	0,234
0,015	0,506	0,503	0,431	0,428	0,429
0,031	0,908	0,859	0,833	0,784	0,809
0,062	1,630	1,562	1,555	1,487	1,521
0,125	2,981	2,920	2,906	2,845	2,875

La courbe standard est construite selon la fonction [PAP] = f(absorbance moyenne), en faisant correspondre l'absorbance moyenne de chaque point de gamme à sa concentration théorique et en appliquant un ajustement de type logistique 4-paramètres. L'utilisation d'un programme informatique permettant de calculer cette fonction à partir des valeurs de la gamme de référence est recommandée. La concentration en PAP dans le contrôle et dans les éluats des échantillons est calculée à l'aide de l'équation de la courbe ainsi construite.

**Attention** : Les valeurs obtenues en dosage grâce à cette équation sont à multiplier par un facteur 50 pour obtenir les concentrations sanguines de PAP chez les nouveau-nés. En effet, un disque de papier standardisé de 3 mm de diamètre contient 3 µL de sang. Ce disque est ensuite élué dans 150 µL de PBS, ce qui correspond à une dilution au 1/50<sup>ème</sup>. Pour revenir à la concentration sanguine de PAP, la valeur mesurée dans l'éluat de tache doit donc être multipliée par ce facteur.

#### Contrôle qualité

L'usage du contrôle interne est recommandé pour s'assurer de la validité des résultats. Le contrôle doit être traité de la même façon que les échantillons, c'est-à-dire que sa valeur théorique en dosage est de 0,02 µg/L mais doit, comme les échantillons, être multipliée par 50 : il est ainsi attendu à 1 µg/L. Ce contrôle doit être inclus dans chaque dosage, comme la gamme de référence : si le dosage du jour comprend plusieurs plaques, le contrôle devra être posé sur chaque plaque.

Il est recommandé que le contrôle ne dévie pas d'un écart de +/-20% par rapport à sa concentration théorique :

Contrôle – Concentration théorique	Limite basse	Limite haute
Contrôle interne - 1 µg/L	0,8 µg/L	1,2 µg/L

Les résultats des échantillons ne doivent être validés que si le résultat du contrôle pour ce dosage satisfait au critère d'acceptabilité.

En cas de problème récurrent ou d'altération de la performance du dosage, merci de contacter Dynabio S.A. par courriel à [info@dynabio.com](mailto:info@dynabio.com) ou par téléphone au +33 (0)4 86 94 85 04.

#### Analyse des résultats des échantillons de nouveau-nés

Calcul de la concentration en PAP dans le sang des nouveau-nés : si le protocole décrit ci-dessus est strictement respecté et si les échantillons proviennent de cartons de dépistage calibrés, poinçonnés avec un diamètre de 3 mm, la concentration sanguine de PAP pour chaque nouveau-né est directement obtenue en utilisant l'équation de la courbe de gamme [PAP] = f(absorbance moyenne) puis en multipliant ce résultat par un facteur 50 comme expliqué ci-dessus.

#### LIMITATIONS DU DOSAGE

L'information sur le dosage de PAP obtenue à l'aide du dispositif MucoPAP doit être utilisée comme un complément des autres dosages et analyses (exemple : dosage IRT) réalisés dans le cadre du dépistage de la mucoviscidose. Elle doit être interprétée en fonction des autres informations cliniques disponibles.

Conditions susceptibles d'induire des résultats analytiques anormaux :

- le carton de dépistage n'est pas saturé de sang uniformément
- l'échantillon a été découpé trop près du bord de la zone de prélèvement
- l'échantillon a été découpé au centre de la tache au lieu de sa périphérie
- l'échantillon a été mal collecté ou mal séché
- l'échantillon a été exposé à la chaleur ou à l'humidité
- le carton est contaminé par de la matière fécale

Se référer également aux sections « Mise en garde et précautions » et « Recommandations d'usage ».

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'évaluation de la concentration de PAP dans les taches de sang est utilisée pour identifier une population de nouveau-nés à haut risque de mucoviscidose. Les stratégies actuellement mises en œuvre se déroulent généralement en trois étapes. Dans la première, le trypsinogène immunoréactif (TIR) est dosé chez tous les nouveau-nés. Dans la deuxième, la PAP est dosée chez les nouveau-nés ayant un TIR élevé. Chez les nouveau-nés ayant TIR et PAP élevés, une troisième étape consiste soit en un test diagnostique, le test de la sueur, soit en une recherche de mutations du gène CFTR éventuellement suivie d'un test de la sueur chez les nouveau-nés portant ces mutations.

Une revue exhaustive des performances des stratégies actuellement utilisées a été réalisée par la Haute Autorité de Santé et publiée en 2015. Elle est disponible sous le titre « Place de la stratégie couplant les dosages de la TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France » à l'adresse suivante : [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1739994/fr/](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1739994/fr/). Il est recommandé de se référer à cette analyse avant de mettre en œuvre un dépistage néonatal de mucoviscidose impliquant un dosage de PAP.

## PERFORMANCES

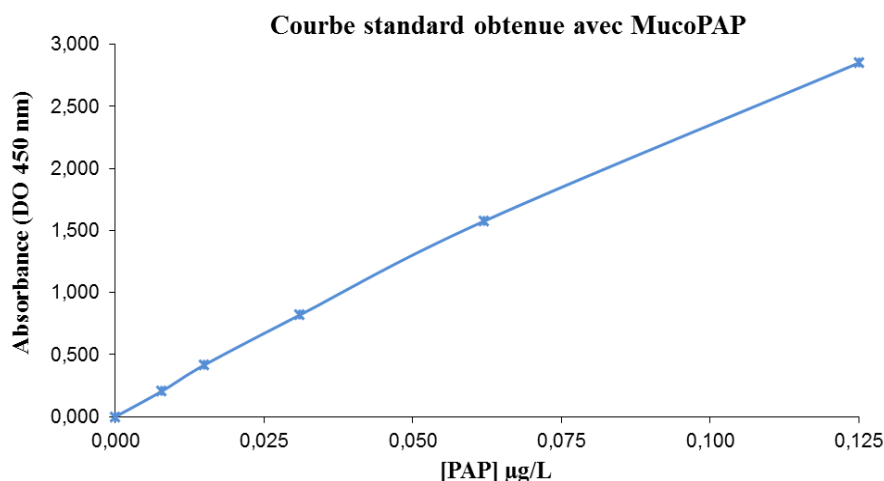
Chez les nouveau-nés ayant une TIR élevée (>50 µg/L) tous les enfants atteints de mucoviscidose ont une PAP > 1,1 µg/L, (à l'exception des formes frustes et des bébés présentant un ileus méconial). Les nouveau-nés atteints représentent environ 25% des nouveau-nés ayant une TIR élevée et une PAP >1,1 µg/L. On trouve parmi les nouveau-nés non atteints de ce groupe des prématurés, des trisomiques ainsi que des bébés souffrant d'infections sévères du système digestif (4).

## CARACTÉRISTIQUES ANALYTIQUES

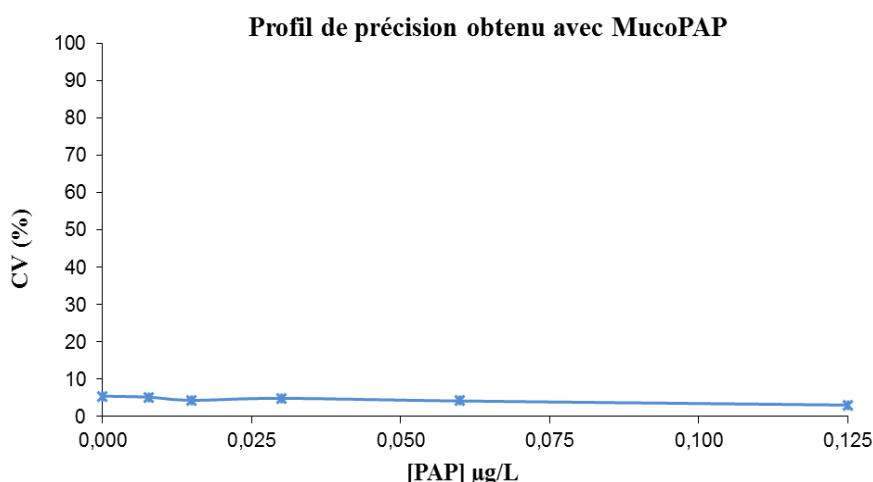
Toutes les données présentées ci-dessous ont été obtenues avec l'appareil Multiskan FC de la marque Thermofisher Scientific dont les caractéristiques sont :

- Agitation de la plaque avant lecture : 5 secondes
- Type d'agitation de la plaque : continue
- Vitesse : moyenne
- Photométrie 1 : densité optique à 450 nm
- Mode mesure : rapide
- Photométrie 2 : densité optique à 620 nm
- Mode mesure : rapide
- Différence (1-2) : densité optique à 450 nm - densité optique à 620 nm

**Courbe standard** : Une courbe standard typique du dispositif MucoPAP est représentée dans le graphique ci-dessous. Elle a été déterminée par dosage en double de chaque point de gamme sur cinq lots différents, soit sur dix répliquats.



**Profil de précision** : Le profil de précision du dispositif MucoPAP a été déterminé par dosage en double de chaque point de gamme sur cinq lots de kits différents, soit sur dix réplicats. Il est schématisé dans le graphique ci-dessous.



**Répétabilité et reproductibilité** : La répétabilité représente la variation intra-lot et la reproductibilité représente la variation inter-lot.

La répétabilité et la reproductibilité du dispositif MucoPAP ont été déterminées en dosant trois échantillons de contrôle sur cinq lots différents. Les contrôles utilisés pour cette détermination sont les suivants :

- le contrôle interne fourni dans le kit, attendu à  $0,02 \times 50 = 1 \mu\text{g/L}$ , dosé en quatre réplicats sur chaque lot ;
- un contrôle externe attendu à  $0,04 \times 50 = 2 \mu\text{g/L}$ , dosé en dix réplicats sur chaque lot ;
- un autre contrôle externe attendu à  $0,10 \times 50 = 5 \mu\text{g/L}$ , dosé en dix réplicats sur chaque lot.

Les résultats obtenus concernant la répétabilité et la reproductibilité sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Valeur attendue du contrôle (µg/L)	Valeur obtenue (µg/L)	Répétabilité (CV en %)	Reproductibilité (CV en %)
1	1,046	4,4	5,2
2	1,990	4,0	4,8
5	4,877	4,9	7,2

**Limites de détection et quantification** : Les limites de détection et de quantification du dosage MucoPAP (exprimées en microgrammes de PAP par litre de sang) sont respectivement de  $0,13 \mu\text{g/L}$  et  $0,24 \mu\text{g/L}$  en considérant que :

- la limite de détection est définie comme étant 3 écart-types au-dessus de la moyenne des mesures du standard zéro
- la limite de quantification est définie comme étant 10 écart-types au-dessus de la moyenne des mesures du standard zéro.

**Réaction croisée** : Avec le dosage MucoPAP, aucune réaction croisée obtenue avec les molécules IL2, IL6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  et les protéines d'*Escherichia coli*.

**Effet crochet** : Absence d'effet crochet jusqu'à une concentration  $1000 \mu\text{g/L}$ , exprimée en microgramme de PAP par litre de sang.

## GARANTIE

Tout changement ou modification de la procédure recommandée par le fabricant peut affecter les résultats. Dans ce cas, Dynabio SA décline toute responsabilité exprimée, implicite ou établie par la loi y compris la responsabilité impliquée par la vente ou le transport pour son utilisation. Dans ce cas, Dynabio SA ne saurait être tenu pour responsable des dommages directs ou indirects en résultant.

## RÉFÉRENCES

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. Barthellemy *et al.* Arch. Pédiatr 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<sup>ème</sup> édition, 2021). Clinical and Laboratory Standards Institute.

## RÉSUMÉ DU DOSAGE

**Ne pas oublier de préparer les éluats des taches de nouveau-nés dans 150 µL de PBS/puits la veille du dosage dans une plaque à fond rond (non fournie dans le kit)**

1. Mettre à température ambiante les plaques de dosage et d'éluations.
2. Préparer le tampon de dilution, la gamme et le contrôle.
3. Après équilibration à température ambiante et préparation de toutes les dilutions, sortir la plaque de son étui et y déposer, après homogénéisation, la gamme, le blanc, le contrôle et les éluats d'échantillons (100 µL/puits, en double).
4. Incuber 3 heures à température ambiante.
5. Finir de préparer le tampon de lavage (ajout du Tween dans le PBS préparé la veille).
6. A la fin de l'incubation de 3 heures, effectuer 5 lavages PBS/Tween, vider la plaque, sécher par tapotements.
7. Distribuer l'anticorps biotinylé (100 µL/puits).
8. Incuber 30 minutes à température ambiante.
9. Effectuer 5 lavages PBS/Tween, vider la plaque, sécher par tapotements.
10. Distribuer le conjugué avidine-peroxydase (100 µL/puits).
11. Incuber 15 minutes à température ambiante.
12. Effectuer 5 lavages PBS/Tween, vider la plaque, sécher par tapotements.
13. Distribuer le substrat chromogène TMB (100 µL/puits).
14. Incuber 15 minutes à température ambiante à l'obscurité.
15. Sans laver, arrêter la réaction par ajout d'acide H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 µL/puits).
16. Lire l'absorbance à 450 nm.

## NOTES