



IFU-MPK02-DE
Version 09
Letzte Überarbeitung: 2022/05

MucoPAPII

PAP-Testkit für das Neugeborenenenscreening auf Mukoviszidose

INSERM-Patent

Enzymimmunoassay

Gebrauchsanweisung und Reagenzien für 96 Dosen

Hergestellt von:

DYNABIO S. A.

Luminy Biotech Unternehmen

Feld 922 - 163, avenue de Luminy

13288 Marseille cedex 9

France

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

www.dynabio.com

REF MPK02

IVD

CE

SYMBOLE



Für diagnostische Zwecke *in vitro*



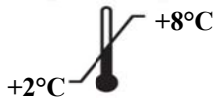
Losnummer



Katalognummer



Ablaufdatum (JJJJ/MM/TT)



Zwischen +2°C und +8°C lagern



Enthält Reagenzien für 96 Dosen



Hinweis: Lesen Sie die Gebrauchsanweisung



Hersteller

INHALT

EINLEITUNG	4
DOSIERUNGSPRINZIP	4
NICHT MITGELIEFERTE AUSRÜSTUNG UND PRODUKTE, DIE FÜR DIE DOSIERUNG BENÖTIGT WERDEN	4
ZUSAMMENSETZUNG DES KITS	5
REAGENZIENBESCHREIBUNG	6
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	7
EMPFEHLUNGEN FÜR DIE NUTZUNG	7
VORBEREITUNG DER PROBEN UND STANDARDS	8
VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	8
DURCHFÜHRUNG DER DOSIERUNG	8
ERGEBNISBERECHNUNG	9
Kalibrierung	9
Qualitätskontrolle	10
Analyse der Ergebnisse von Proben von Neugeborenen	10
DOSIERUNGSBEGRENZUNGEN	10
INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	11
PERFORMANCE	11
ANALYSEMERKMALE	11
GARANTIE	12
REFERENZEN	13
DOSIERUNGSZUSAMMENFASSUNG	13

EINLEITUNG

Das Pankreatitis-assoziierte Protein (PAP, auch bekannt als Reg3A) wird von der Bauchspeicheldrüse im Verlauf des Pankreasleidens synthetisiert. Bei Mukoviszidose wird die Bauchspeicheldrüse *in utero geschädigt* und produziert PAP. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die PAP-Konzentration im Blut von betroffenen Neugeborenen erhöht ist (1, 2, 3, 4, 5).

Die PAP-Bestimmung auf den kalibrierten Screening-Kartons ermöglicht daher die Identifizierung von Neugeborenen, die möglicherweise an Mukoviszidose erkrankt sind.

DOSIERUNGSPRINZIP

Der MucoPAPII-Kit dient zur quantitativen Bestimmung von PAP in Blutproben von Neugeborenen, die auf kalibrierten und behördlich zugelassenen Screening-Kartons abgegeben werden. Es handelt sich um einen Sandwich-Immunoassay, der eine enzymatische Entwicklungstechnik (ELISA) verwendet. Der Referenzbereich des Assays und die internen Kontrollen werden in Form von Blutflecken auf kalibrierten Screening-Kartons präsentiert, ebenso wie die zu testenden Proben.

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit Anti-PAP-Antikörpern beschichtet. Die Eluate der Blutflecken werden in die Vertiefungen gegeben und das darin enthaltene PAP bindet an die spezifischen Antikörper. Nicht gebundene Proteine werden durch Waschen entfernt. Biotin-markierte Anti-PAP-Antikörper werden dann in die Vertiefungen gegeben und binden an das immobilisierte PAP. Nach Waschungen wird der Antigen-Antikörper-Komplex durch einen Avidin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen. Nach einem weiteren Waschschrift führt die Zugabe eines chromogenen Substrats des Peroxidase-Enzyms zum Auftreten eines blau gefärbten Produkts. Das Stoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von Säure wandelt die blaue Färbung in eine Gelbfärbung um, die spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen werden kann. Die Intensität der abgegebenen Färbung ist proportional zur Menge des im Ausgangseluat enthaltenen PAP.

NICHT MITGELIEFERTE AUSRÜSTUNG UND PRODUKTE, DIE FÜR DIE DOSIERUNG BENÖTIGT WERDEN

Material :

- Vortex-Schüttler
- Plattenwäscher (automatisch oder halbautomatisch)
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten, ausgestattet mit einem 450 nm-Filter (und eventuell einem 630 nm-Filter, um die verbleibende Intensität der Blaufärbung von der bei 450 nm gemessenen optischen Dichte abzuziehen).
- Computer, der mit dem Spektrophotometer gekoppelt ist, um die Ergebnisse zu analysieren
- Automatische Ein- und Mehrkanal-Mikropipetten
- 1-Liter-Plastikbehälter (Waschpuffer)
- Manuelle oder automatische Stanze zum Ausstanzen von Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 3 mm
- Zwei Liter destilliertes Wasser

Einwegmaterial :

- 96-Well-Platte mit rundem Boden (für die Elution von Blutflecken)
- Spitzen für Mikropipetten
- 10 mL Plastikpipetten
- Fünf beschriftbare Einweg-Reagenzbehälter (einer pro Reagenz) : PBS, biotinylierte Antikörper, Avidin-Peroxidase, chromogenes Substrat und Säure
- Blutflecken von Neugeborenen auf geeichten und von den zuständigen Behörden genehmigten Testkartons

ZUSAMMENSETZUNG DES KITS

Jeder Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Das Verfallsdatum ist auf allen Etiketten des Kits vermerkt.

Da die Mikrotiterplatte in Form von herausnehmbaren Streifen angeboten wird, kann der Assay an die Anzahl der zu dosierenden Proben angepasst werden. Jede Dosierung muss jedoch eine Referenzreihe und Kontrollen enthalten.

REAGENZEN	KONSERVATION VOR DEM ÖFFNEN	MERKMALE DER NUTZUNG	KONSERVATION APRÈS ERÖFFNUNG
Mikrotiterplatte (96 Wells in horizontalen Streifen von 8 x 12 Wells)	In der Originalverpackung vor Licht geschützt aufbewahren zwischen +2°C und +8°C bis zum Verfallsdatum.	Mit Anti-PAP-Antikörpern beschichtet. Gebrauchsfertig.	Bei +2°C bis +8°C in den dafür vorgesehenen Beuteln mit Trockenmittel bis zu 30 Tage lang aufbewahren.
Referenz-PAP-Bereich		Blutflecken auf kalibriertem Filterpapier zum Stanzen und eluieren in 150 µL PBS eine Nacht (16 Stunden) zwischen +2°C und +8°C.	
Interne Kontrollen			
Biotinylierte Anti-PAP- Antikörper	Stabil zwischen +2°C und +8°C bis zum Verfallsdatum.	Lyophilisat in 11 mL destilliertem Wasser vorsichtig wieder aufnehmen, direkt in die Flasche.	Bei -20°C bis zu 30 Tage lang aufbewahren.
Avidin-Peroxidase-Konjugat			
Chromogenes Substrat (TMB)		15-mL-Flasche gebrauchsfertig.	Bei +2°C bis +8°C bis zu 30 Tage lang aufbewahren.
Säure (H ₂ SO ₄)		11-mL-Flasche gebrauchsfertig.	
PBS-Tablette		In 1 L destilliertem Wasser auflösen. 20 mL für die Blutfleckenelution reservieren.	Bewahren Sie den vorbereiteten Waschpuffer bei - 20°C bis zu 30 Tage lang auf.
Tween 20-Lösung		Gib zu den restlichen 980 mL PBS hinzu, um den Waschpuffer zu erhalten.	

Das Kit kann innerhalb von 30 Tagen nach dem Öffnen verwendet werden, wenn die in der Tabelle oben aufgelisteten Empfehlungen korrekt angewendet werden.

So wie er von Dynabio geliefert wird, ist der MucoPAPII-Assay-Kit nicht automatisiert.

REAGENZIENBESCHREIBUNG

REAGENZEN	BESCHREIBUNG	KONZENTRATION DES WIRKSTOFFS
Mikrotiterplatte (96 Wells in horizontalen Streifen von 8 x 12 Wells)	Vertiefungen, die mit monoklonalen Antikörpern von Mäusen beschichtet sind, die spezifisch gegen PAP gerichtet sind	4 µg/mL
Referenz-PAP-Bereich	Filterpapier, das 2 Serien von 6 mit PAP ergänzten Trockenblutflecken für den Bereich enthält	0 µg PAP/L Blut 0,39 µg PAP/L Blut 0,78 µg PAP/L Blut 1,56 µg PAP/L Blut 3,13 µg PAP/L Blut 6,25 µg PAP/L Blut
Interne Kontrollen	Filterpapier mit 2 Serien von 3 Flecken getrocknetem Blut, das mit PAP ergänzt wurde, als Kontrollen	Low: 1 µg PAP/L Blut Medium: 2 µg PAP/L Blut High: 3 µg PAP/L Blut
Biotinylierte Anti-PAP-Antikörper	Monoklonale Antikörper von Mäusen, die spezifisch für PAP sind, mit Biotin gekoppelt, in Phosphatpuffer die Schutzmittel enthalten	0,25 µg/mL
Avidin-Peroxidase-Konjugat	Avidin, an das Enzym Peroxidase gekoppelt, in Phosphat-/Zitratpuffer mit Schutzmitteln	0,16 µg/mL
Chromogenes Substrat (TMB)	Chromogene Substratlösung des Enzyms Peroxidase 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	≤ 0.05%
Säure (H ₂ SO ₄)	Verdünnte Schwefelsäurelösung	5,4%
PBS-Tablette	Salzphosphat-Puffer	/
Tween 20	Konzentrierte Waschmittellösung	10%

ENTNAHME UND VERARBEITUNG VON PROBEN

Blutproben sollten durch Fersenstich entnommen und direkt auf einem zugelassenen Filterpapier (Referenzmethode) gesammelt werden.

Die Methode und das gesamte Gerät zur Probenahme müssen den Vorschriften des Landes entsprechen, in dem sie verwendet werden.

Es wird empfohlen, die Vorschriften bezüglich des erforderlichen Probentyps und des angemessenen Zeitraums für die Probenerhebung gemäß dem geltenden Neugeborenencreeningprogramm zu konsultieren. Dieses legt auch fest, innerhalb welcher Zeit nach der Probengewinnung der PAP-Test durchgeführt werden muss.

Die Ergebnisse eines Assays auf der Grundlage getrockneter Blutproben hängen direkt von der Sorgfalt ab, mit der die Proben gesammelt, gehandhabt, übertragen und aufbewahrt werden. In einer Dokumentation (6) werden die Methoden zur Probengewinnung und die akzeptablen Techniken zum Aufbringen von Bluttröpfen oder -aliquots auf standardisiertes Filterpapier genau beschrieben. Sie enthält auch Anweisungen zur korrekten Handhabung, zum Transport und zur Aufbewahrung der Proben, um sicherzustellen, dass beim Neugeborenencreening qualitativ hochwertige Ergebnisse erzielt werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Dieses Kit darf nur *in der In-vitro-Diagnostik* von speziell geschultem Personal mit entsprechender Schutzausrüstung verwendet werden.

Getrocknete Patienten-, Sortiments- und Kontrollblutflecken sowie biotinylierte Antikörper enthalten Blutbestandteile menschlichen oder tierischen Ursprungs: Sie sollten als potenziell infektiös betrachtet und unter Beachtung der notwendigen Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz des Anwenders gehandhabt werden.

Beziehen Sie sich bezüglich der Entsorgung auf das Sicherheitsdatenblatt des Produkts. Der Abfall muss gemäß den Vorschriften des Landes, in dem er verwendet wird, entsorgt werden.

Nicht in den Mund pipettieren.

Während der Handhabung nicht essen, trinken oder rauchen.

Die folgenden Reagenzien können giftig oder reizend sein: PBS, chromogenes Substrat (TMB) und Säurelösung (H₂ SO₄). Kontakt mit der Haut, den Augen und den Schleimhäuten vermeiden. Bei versehentlichem Kontakt mit viel Wasser spülen.

Jeder schwerwiegende Vorfall im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder Patient niedergelassen ist, zu melden.

EMPFEHLUNGEN FÜR DIE NUTZUNG

Erstellen Sie ein genau zu befolgendes Plattenschema, das die Reihenfolge festlegt, in der die Punkte für den Bereich, die Leerstellen, die Kontrollen und die Proben von Neugeborenen in die Vertiefungen gelegt werden, um ein Vertauschen der Stempel zu vermeiden.

Vermeiden Sie eine biologische oder chemische Kontamination der Proben.

Verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.

Mischen Sie keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen.

Alle Reagenzien bei Raumtemperatur (zwischen +19°C und +22°C) ausgleichen und vor Gebrauch schütteln.

Vermeiden Sie eine Kreuzkontamination zwischen den verschiedenen Reagenzien: Verwenden Sie für jedes Reagenz einen anderen Behälter (Behälter nicht im Lieferumfang enthalten).

Halte dich strikt an die für jeden Schritt angegebene Inkubationszeit.

Die Waschungen müssen sorgfältig durchgeführt werden, um eine Erhöhung des Hintergrundrauschens zu vermeiden.

Lassen Sie die Platte niemals austrocknen, da dies die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen würde.

Der biotinylierte Antikörper und die lyophilisierte Avidin-Peroxidase sollten mindestens 10 Minuten vor dem Test zubereitet werden, damit sie sich vollständig auflösen und die Reagenzien homogen sind.

Das TMB-Substrat sollte vor der Verwendung nicht der Luft und dem Licht ausgesetzt werden.

Im Falle einer Beschädigung des Kits während des Transports (zerbrochene und/oder verschüttete Fläschchen, wiederaufgeblasene Aluminiumbeutel) wenden Sie sich bitte an Dynabio S. A. per E-Mail an info@dynabio.com oder telefonisch unter +33 (0)4 86 94 85 04.

VORBEREITUNG DER PROBEN UND STANDARDS

Am Vorabend der Dosierung:

Lösen Sie die mitgelieferte PBS-Tablette in 1 L destilliertem Wasser auf. Nach vollständigem Homogenisieren verwenden Sie 20 mL für die Elution der Blutflecken: Die restlichen 980 mL werden bis zum nächsten Tag, dem Tag der Bestimmung, bei +2°C bis +8°C aufbewahrt, um den Waschpuffer vorzubereiten.

Zu dosierende Proben: Schneiden Sie aus den Kartons ein Pellet mit einem Durchmesser von 3 mm aus, unbedingt am Rand des Blutflecks, in einem Bereich, in dem das Blut den Karton vollständig durchdrungen hat, ohne Überladung oder doppelte Ablagerungen. Legen Sie das Pellet in ein Well einer 96-Well-Platte mit rundem Boden (nicht im Kit enthalten). Um einen doppelten Assay zu erhalten, stanzen Sie an zwei verschiedenen Stellen auf demselben Blutfleck. Geben Sie 150 µL PBS-Puffer in jede Vertiefung. Mindestens 16 Stunden (über Nacht) bei +2°C bis +8°C eluieren.

Referenzsortiment: Wie bei den Dosierproben wird auch in die Sortimentskartons ein Pellet mit einem Durchmesser von 3 mm gestanzt, und zwar unbedingt am Rand des Flecks. Die sechs Punkte der Skala sind doppelt zu stanzen. Jedes Pellet in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte mit rundem Boden legen (nicht im Kit enthalten). Geben Sie 150 µL PBS-Puffer pro Vertiefung hinzu. Mindestens 16 Stunden (über Nacht) bei +2°C bis +8°C eluieren. Man erhält dann sechs Skalenpunkte: 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 und 0 µg/L.

Interne Kontrollen: Wie das Sortiment sind auch die drei internen Kontrollen aus dem im Kit angebotenen kalibrierten Karton doppelt zu stanzen, unbedingt am Rand des Flecks (Pellets mit einem Durchmesser von 3 mm). Legen Sie jedes Pellet in ein Well einer 96-Well-Platte mit rundem Boden (nicht im Kit enthalten). Geben Sie 150 µL PBS-Puffer pro Vertiefung hinzu. Mindestens 16h (über Nacht) bei +2°C bis +8°C eluieren. Die PAP-Konzentration in den drei Kontrollen beträgt jeweils 1 µg/L (Low Control), 2 µg/L (Medium Control) und 3 µg/L (High Control).

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Am Tag des Assays: Nach dieser Inkubation über Nacht müssen alle Eluate bei der Entnahme der zu bestimmenden 100 µL durch Ansaugen und Ausstoßen homogenisiert werden. Die Spitzen der Mikropipetten müssen unbedingt zwischen jedem Homogenisieren von Proben-, Skalenpunkt- oder Kontroll-Eluaten gewechselt werden.

Dosierplatte: Die vakuumverpackte Platte muss bei Raumtemperatur ausbalanciert werden, bevor sie aus der Aluminiumverpackung entnommen wird. Nach dem Öffnen muss die Platte vom Anwender identifiziert werden, damit sie nicht mit einer anderen Platte verwechselt wird, die am selben Tag behandelt wurde. Alle Streifen jeder Platte müssen ebenfalls gekennzeichnet werden (von A bis H), damit sie nicht vertauscht werden, falls sie sich während der Waschschriffe aus ihrem Rahmen lösen.

Waschpuffer (PBS-0,1% Tween) : Füge dem Rest der am Vortag aufgelösten PBS (980 mL) den gesamten Inhalt der mitgelieferten Flasche Tween 20 (10%) hinzu und homogenisiere.

Biotinylierte Antikörper : Das Lyophilisat wird vorsichtig in 11 mL destilliertem Wasser direkt in der Durchstechflasche aufgenommen. Nach vollständiger Auflösung und Homogenisierung ist es gebrauchsfertig.

Avidin-Peroxidase: Das Lyophilisat wird vorsichtig in 11 mL destilliertem Wasser direkt in der Flasche aufgenommen. Nach vollständiger Auflösung und Homogenisierung ist es gebrauchsfertig.

Chromogenes Substrat TMB: Flüssige Lösung, die nach dem Homogenisieren gebrauchsfertig ist.

Säure H₂ SO₄ : Flüssige Lösung, die nach dem Homogenisieren gebrauchsfertig ist.

DURCHFÜHRUNG DER DOSIERUNG

Eine PAP-Linie wird erhalten, indem die sechs im Kit enthaltenen Standardkonzentrationen in PBS eluiert werden. Sie umfasst Lösungen mit den Konzentrationen 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 und 0 µg/L, die in zweifacher Ausführung erhalten wurden.

Jeder doppelt eluierte Skalenpunkt wird nach der Homogenisierung in die Assay-Platte gegeben (100 µL/Vertiefung). Die Spitzen der Mikropipetten müssen unbedingt zwischen jeder Homogenisierung des Eluats der Messpunkte gewechselt werden.

In den beiden Vertiefungen, die 100 µL des 0 µg/L-Punktes erhalten, wird das Hintergrundrauschen des Assays bewertet.

Die Eluate der Probenflecken sowie die Eluate der internen Kontrollen werden nach der Homogenisierung in doppelter Ausführung in die Testplatte gegeben (100 µL/Vertiefung). Die Spitzen der Mikropipetten müssen unbedingt zwischen jeder Homogenisierung von Proben- oder Kontroll-Eluaten gewechselt werden.

Diese Ablagerungen werden 3 Stunden bei Raumtemperatur (+19°C bis +22°C) inkubiert, wobei die Platte zuvor mit einem Klebstoff abgedeckt wird.

Die Wells werden dann wie folgt fünfmal mit dem zuvor hergestellten PBS/Tween-Waschpuffer gewaschen:

- den Inhalt der Platte absaugen,
- jede Vertiefung mit ~300 µL PBS/Tween-Puffer füllen
- wiederholen Sie diese beiden Schritte viermal,
- entferne nach dem letzten Waschgang die restliche Flüssigkeit, indem du die Platte kräftig umdrehst (in ein Waschbecken oder einen Behälter für flüssige Abfälle) und sie dann auf einem saugfähigen Papier ausklopfst.

NB: Die Verwendung eines automatischen oder halbautomatischen Wäschers wird empfohlen.

Die Lösung der biotinylierten Antikörper wird sofort aufgetragen (100 µL/Vertiefung) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Platte mit einem Klebstoff abgedeckt wird.

Die Platte wird wie oben beschrieben fünfmal gewaschen.

Das Avidin-Peroxidase-Konjugat wird sofort zugegeben (100 µL/Vertiefung) und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Platte mit einem Klebstoff abgedeckt wird.

Die Platte wird wie oben beschrieben fünfmal gewaschen.

Anschließend wird das chromogene Substrat (TMB) hinzugefügt (100 µL/Vertiefung) und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die mit Klebstoff abgedeckte Platte im Dunkeln steht.

Nach dieser Inkubation tritt in den Vertiefungen eine unterschiedlich starke Blaufärbung auf: Ohne einen Waschvorgang durchzuführen, geben Sie direkt 100 µL/Vertiefungen der Säurelösung hinzu, um die Enzymreaktion zu stoppen. Diese Zugabe erhöht das Gesamtvolumen auf 200 µL/Vertiefung und wandelt die Blaufärbung in eine Gelbfärbung um.

Die Extinktion jeder Vertiefung sollte innerhalb von 30 Minuten nach Abbruch der Reaktion mit einem Spektralphotometer mit einem 450 nm-Filter abgelesen werden.

NB: Einige Spektralphotometer sind so programmiert, dass sie ein erstes Mal bei 450 nm und dann ein zweites Mal mit einem Referenzfilter bei 630 nm lesen. Die Extinktion bei 630 nm wird dann von der Extinktion bei 450 nm subtrahiert, um die verbleibende Intensität der blauen Färbung zu eliminieren. Der Filter bei 630 nm ist jedoch nicht unbedingt erforderlich.

ERGEBNISBERECHNUNG

Kalibrierung

Für jeden durchgeführten Assay sollte eine Standardkurve erstellt werden. Wenn die Tagesdosis aus mehreren Platten besteht, muss die Kurve auf jede Platte gelegt werden.

Um diese Kurve zu erhalten, muss zunächst das Hintergrundrauschen des Assays berechnet werden, das dem Mittelwert der für den Leerwert (Punkt bei 0 µg/L) erhaltenen Werte entspricht, und dann von den für alle Skalenpunkte erhaltenen Rohergebnissen subtrahiert werden.

Dieses Hintergrundrauschen muss ebenfalls vom Signal jedes Replikats der Kontrollen und Proben abgezogen werden, bevor der Mittelwert der beiden Replikate berechnet wird.

Die folgende Tabelle ist ein Beispiel für die Ergebnisse, die für einen Referenzbereich mit einem durchschnittlichen Hintergrundrauschen mit einer optischen Dichte von 0,068 (nur zur Veranschaulichung) erzielt wurden:

PAP (µg/L)	Absorption (Optische Dichte bei 450 nm)				Durchschnitt
	Replik 1	Replik 2	Replik 1 - durchschnittliches Hintergrundrauschen	Replik 2 - durchschnittliches Hintergrundrauschen	
0	0,064	0,072			
0,39	0,294	0,269	0,226	0,201	0,214
0,78	0,532	0,450	0,464	0,382	0,423
1,56	0,808	1,009	0,740	0,941	0,841
3,13	1,581	1,781	1,513	1,713	1,613
6,25	3,013	2,878	2,945	2,810	2,877

Die Standardkurve wird gemäß der Funktion $[PAP] = f(\text{mittlere Extinktion})$ konstruiert, wobei die mittlere Extinktion jedes Skalenpunktes seiner theoretischen Konzentration entspricht und eine 4-Parameter-Logistik-Anpassung angewendet wird. Die Verwendung eines Computerprogramms zur Berechnung dieser Funktion aus den Werten des Referenzbereichs wird empfohlen. Die PAP-Konzentration in den Eluatn der Flecken (Kontrollen und Proben) wird mit Hilfe der Gleichung der so konstruierten Kurve berechnet.

Qualitätskontrolle

Die Verwendung von internen Kontrollen wird empfohlen, um die Gültigkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Die Kontrollen sollten auf die gleiche Weise wie die Proben behandelt werden. Drei Kontrollen, die steigenden PAP-Konzentrationen entsprechen (low, medium, high), sind im Kit enthalten. Diese Kontrollen müssen in jedem Assay enthalten sein: Wenn der Assay des Tages mehrere Platten umfasst, müssen die Kontrollen auf jeder Platte angebracht werden.

Es wird empfohlen, dass die Kontrollen nicht mehr als +/-20% von ihrer theoretischen Konzentration abweichen :

Kontrolle - Theoretische Konzentration	Untere Grenze	Obergrenze
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

Die Ergebnisse der Proben sollten nur dann validiert werden, wenn die Kontrollergebnisse für diesen Assay die Akzeptanzkriterien erfüllen.

Bei wiederkehrenden Problemen oder einer Beeinträchtigung der Dosierungsleistung wenden Sie sich bitte an Dynabio S. A. per E-Mail an info@dynabio.com oder telefonisch unter +33 (0)4 86 94 85 04.

Analyse der Ergebnisse von Proben von Neugeborenen

Berechnung der PAP-Konzentration im Blut von Neugeborenen: Wenn das oben beschriebene Protokoll strikt eingehalten wird und die Proben aus kalibrierten Screening-Kartons stammen, die mit einem Durchmesser von 3 mm gestanzt wurden, wird die PAP-Konzentration im Blut für jedes Neugeborene direkt unter Verwendung der Gleichung für die Bereichskurve $[PAP] = f(\text{mittlere Extinktion})$ ermittelt.

DOSIERUNGSBEGRENZUNGEN

Die mit dem MucoPAPII-Kit erhaltene Information über den PAP-Test sollte als Ergänzung zu anderen Tests und Untersuchungen (Beispiel: IRT-Test) verwendet werden, die im Rahmen des Screenings auf Mukoviszidose durchgeführt werden. Er sollte auf der Grundlage anderer verfügbarer klinischer Informationen interpretiert werden.

Bedingungen, die zu abnormalen Analyseergebnissen führen können :

- der Testkarton nicht gleichmäßig mit Blut gesättigt ist,
- die Probe wurde zu nah am Rand des Probenahmebereichs abgeschnitten,
- die Probe wurde in der Mitte des Flecks statt an seinem Rand geschnitten,
- die Probe wurde nicht richtig gesammelt oder nicht richtig getrocknet,
- die Probe wurde Hitze oder Feuchtigkeit ausgesetzt,
- der Karton mit Fäkalien verunreinigt ist.

Siehe auch die Abschnitte "Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen" und "Gebrauchsempfehlungen".

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Beurteilung der PAP-Konzentration in Blutflecken wird verwendet, um eine Population von Neugeborenen mit hohem Risiko für Mukoviszidose zu identifizieren. Die derzeit angewandten Strategien bestehen in der Regel aus drei Schritten. In der ersten Phase wird bei allen Neugeborenen das immunreaktive Trypsinogen (IRT) bestimmt. In der zweiten Phase wird bei Neugeborenen mit einem hohen TIR-Wert der PAP-Wert bestimmt. Bei Neugeborenen mit erhöhtem TIR und PAP wird in einem dritten Schritt entweder ein diagnostischer Test, der Schweißtest, durchgeführt oder es wird nach Mutationen im CFTR-Gen gesucht, eventuell gefolgt von einem Schweißtest bei Neugeborenen mit diesen Mutationen.

Eine umfassende Überprüfung der Leistungsfähigkeit der derzeit verwendeten Strategien wurde von der Haute Autorité de Santé durchgeführt und 2015 veröffentlicht. Sie ist unter dem Titel "*Place de la stratégie couplant les dosages de TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France*" unter folgender Adresse verfügbar:

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

Es wird empfohlen, sich auf diese Analyse zu beziehen, bevor ein Neugeborenencreening auf Mukoviszidose durchgeführt wird, das eine PAP-Bestimmung beinhaltet.

PERFORMANCE

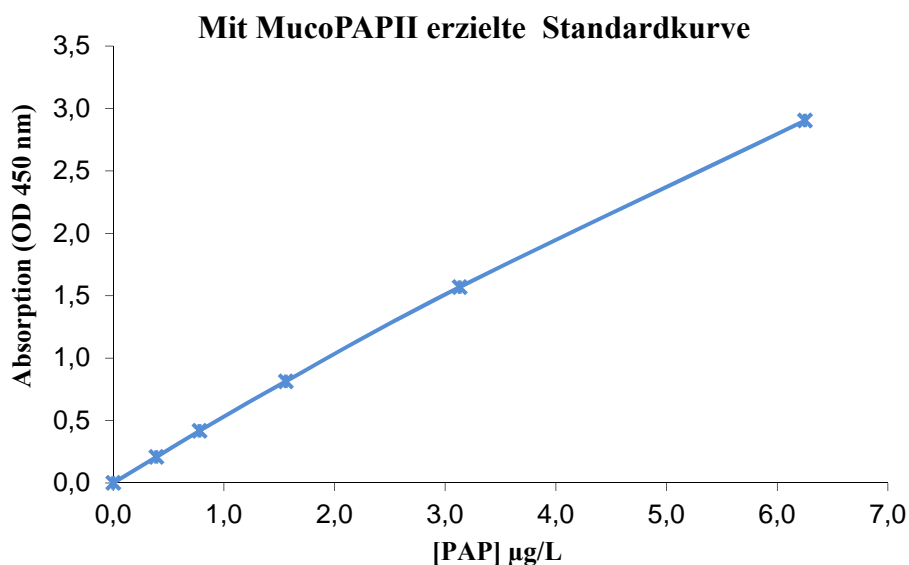
Bei Neugeborenen mit hohem IRT (>50 µg/L) haben alle Kinder mit Mukoviszidose einen PAP von >1,5 µg/L (mit Ausnahme von frustranen Formen und Babys mit Mekoniumileus). Betroffene Neugeborene machen etwa 25% der Neugeborenen mit hohem IRT und einem PAP >1,5 µg/L aus. Unter den nicht betroffenen Neugeborenen dieser Gruppe finden sich Frühgeborene, Babys mit Down-Syndrom sowie Babys mit schweren Infektionen des Verdauungstrakts (4).

ANALYSEMERKMALE

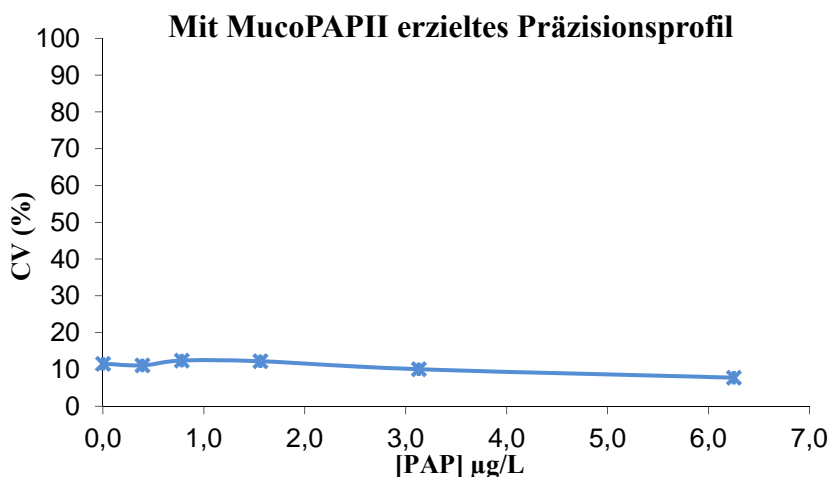
Alle nachfolgend dargestellten Daten wurden mit dem Multiskan FC-Gerät der Marke Thermofisher Scientific ermittelt, das folgende Merkmale aufweist:

- Schütteln der Platte vor dem Ablesen: 5 Sekunden
- Art des Rührens der Platte: kontinuierlich
- Geschwindigkeit: mittel
- Photometrie 1: Optische Dichte bei 450 nm
- Messmodus: schnell
- Photometrie 2: Optische Dichte bei 620 nm
- Messmodus: schnell
- Differenz (1-2): Optische Dichte bei 450 nm - Optische Dichte bei 620 nm

Standardkurve: Eine typische Standardkurve des MucoPAPII-Geräts ist in der folgenden Grafik dargestellt. Sie wurde ermittelt, indem vier verschiedene Chargen verwendet und die sechs Skalenpunkte jeder Charge neunmal gestanzt wurden.



Genauigkeitsprofil: Das Genauigkeitsprofil des MucoPAPII-Geräts wurde unter Verwendung von vier verschiedenen Chargen und durch neunmaliges Stanzen der sechs Skalenpunkte jeder Charge erstellt. Es ist unten dargestellt.



Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit: Die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit des MucoPAPII-Geräts wurde bestimmt, indem fünf verschiedene Kit-Chargen verwendet und jede der drei internen Kontrollen, die in jedem Kit enthalten sind, neunmal gestanzt wurde.

Die Wiederholbarkeit repräsentiert die Variation innerhalb einer Charge (n = 9) und die Reproduzierbarkeit die Variation zwischen den Chargen (n = 5).

Erwartungswert der Kontrolle (µg/L)	Erhaltener Wert (µg/L)	Wiederholbarkeit (CV in %)	Reproduzierbarkeit (CV in %)
1	1,044	12,1	12,3
2	2,075	10	10,8
3	3,134	8,2	8,5

Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen: Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen des MucoPAPII-Assays (ausgedrückt in Mikrogramm PAP pro Liter Blut) betragen 0,084 µg/L bzw. 0,143 µg/L unter der Annahme, dass :

- die Nachweisgrenze ist definiert als 3 Standardabweichungen über dem Mittelwert der Messungen des Nullstandards
- die Quantifizierungsgrenze ist definiert als 10 Standardabweichungen über dem Mittelwert der Messungen des Nullstandards.

Kreuzreaktion: Beim MucoPAPII-Assay wurden keine Kreuzreaktionen mit den Molekülen IL2, IL6, IFN, TNF und *Escherichia-coli-Proteinen* festgestellt.

Hook-Effekt: Kein Hook-Effekt bis zu einer PAP-Konzentration von 1000 µg/L, ausgedrückt in Mikrogramm PAP pro Liter Blut.

GARANTIE

Jede Änderung oder Modifikation des vom Hersteller empfohlenen Verfahrens kann die Ergebnisse beeinflussen. In diesem Fall wird Dynabio S. A. jede ausdrückliche, implizite oder gesetzlich festgelegte Haftung ablehnen, einschließlich der Haftung, die durch den Verkauf oder den Transport für den Gebrauch impliziert wird. In diesem Fall ist Dynabio S. A. nicht für daraus resultierende direkte oder indirekte Schäden haftbar gemacht werden.

REFERENZEN

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, 7^{ème} édition, 2021). Clinical and Laboratory Standards Institute.

DOSIERUNGSZUSAMMENFASSUNG

Vergessen Sie nicht, die Eluate der Blutflecken in PBS (150 µL/Well) am Tag vor dem Test vorzubereiten. in einer Platte mit rundem Boden (nicht im Kit enthalten)

1. Stellen Sie die Assay- und Elutionsplatten auf Raumtemperatur.
2. Nach dem Äquilibrieren bei Raumtemperatur nehmen Sie die Assay-Platte aus dem Etui und geben nach dem Homogenisieren die Eluate der Assay-Flecken, der drei Kontrollen und der Proben auf die Platte (100 µL/Vertiefung).
3. 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Beende die Herstellung des Waschpuffers (Zugabe von Tween in die am Vortag hergestellte PBS).
5. Am Ende der 3-stündigen Inkubationszeit 5 PBS/Tween-Wäschen durchführen, Platte leeren, abklopfen und trocknen.
6. Verteilen Sie den biotinylierten Antikörper (100 µL/Vertiefung).
7. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 5 PBS/Tween-Waschgänge durchführen, Platte leeren, abklopfen und trocknen.
9. Verteilen Sie das Avidin-Peroxidase-Konjugat (100 µL/Vertiefung).
10. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. 5 PBS/Tween-Waschgänge durchführen, Platte leeren, abklopfen und trocknen.
12. Verteile das chromogene Substrat TMB (100 µL/Vertiefung).
13. 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
14. Ohne zu waschen, stoppe die Reaktion durch Zugabe von H₂ SO₄ Säure (100 µL/Vertiefung).
15. Lesen Sie die Extinktion bei 450 nm ab.

NOTES