



IFU-MPK02-FR
Version 09
Dernière révision : 2022/05

MucoPAPII

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 9

France

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

www.dynabio.com

REF MPK02

IVD

CE

SYMBOLES



Pour usage diagnostique *in vitro*



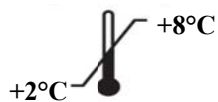
Numéro de lot



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

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

INTRODUCTION

La Protéine Associée à la Pancréatite (PAP, aussi connue sous le nom de Reg3A) est synthétisée par le pancréas au cours de la souffrance pancréatique. En cas de mucoviscidose, le pancréas est 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 MucoPAPII 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 les contrôles internes sont présentés sous forme de taches de sang déposées sur cartons de dépistage calibrés, tout comme les échantillons à doser.

Les puits de la plaque de microtitration sont revêtus d'anticorps anti-PAP. Les éluats des taches de sang 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'éluat de départ.

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 spectrophotomètre pour l'analyse des résultats
- Micropipettes automatiques mono- et multicanaux
- Contenant en plastique 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'éluat 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 des contrôles.

| 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 leur 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 les sachets avec dessiccant fournis à cet effet, pendant 30 jours maximum. |
| Gamme de PAP de référence | | Taches de sang sur papier filtre calibré à poinçonner et à éluer dans 150 µL de PBS une nuit (16 heures) entre +2°C et +8°C. | |
| Contrôles internes | | | |
| Anticorps anti-PAP biotinylés | Stable entre +2°C et +8°C jusqu'à la date de péremption. | Lyophilisat à reprendre délicatement dans 11 mL d'eau distillée, directement dans le flacon. | Conserver à -20°C pendant 30 jours maximum. |
| 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 ₂ SO ₄) | | Flacon de 11 mL prêt à l'emploi. | |
| Pastille de PBS | | Dissoudre dans 1 L d'eau distillée. Réserver 20 mL pour l'élution des taches de sang. | Conserver à -20°C le tampon de lavage préparé pendant 30 jours maximum. |
| Solution de Tween 20 | | Ajouter aux 980 mL de PBS restants pour obtenir le tampon de lavage. | |

La trousse peut être utilisée dans les 30 jours suivant son ouverture si les recommandations listées dans le tableau ci-dessus sont correctement appliquées.

Telle que fournie par Dynabio, la trousse de dosage MucoPAPII 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 | Papier filtre contenant 2 séries de 6 taches de sang séché supplémenté en PAP pour la gamme | 0 µg PAP/L de sang 0,39 µg PAP/L de sang 0,78 µg PAP/L de sang 1,56 µg PAP/L de sang 3,13 µg PAP/L de sang 6,25 µg PAP/L de sang |
| Contrôles internes | Papier filtre contenant 2 séries de 3 taches de sang séché supplémenté en PAP pour les contrôles | Low: 1 µg PAP/L de sang Medium: 2 µg PAP/L de sang High : 3 µg PAP/L de sang |
| 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 |
| 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 ₂ SO ₄) | 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 en vigueur dans le pays d'utilisation.

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, de gamme et contrôle, ainsi que les anticorps biotinylés contiennent des éléments sanguins d'origine humaine ou animale : 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 (H₂SO₄). Eviter 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 des poinçons.

Eviter toute contamination biologique ou chimique des échantillons.

Ne pas utiliser de réactifs périmés.

Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

Equilibrer tous les réactifs à température ambiante (entre +19°C et +22°C) et les agiter avant emploi.

Eviter 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.

L'anticorps biotinylé et l'avidine-peroxydase lyophilisés 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, sachets aluminium regonflés) merci de contacter Dynabio S.A. par courriel à info@dynabio.com ou par téléphone au +33 (0)4 86 94 85 04.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET DES STANDARDS

La veille du dosage :

Dissoudre la tablette de PBS fournie dans 1 L d'eau distillée. Après complète homogénéisation, utiliser 20 mL pour l'éluion des taches de sang : les 980 mL restants sont gardés entre +2°C et +8°C jusqu'au lendemain, jour du dosage, pour préparer le tampon de lavage.

Echantillons 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 µL de tampon PBS dans chaque puits. Eluer au moins 16 heures (une nuit) entre +2°C et +8°C.

Gamme de référence : Tout comme les échantillons à doser, poinçonner dans les cartons de gamme une pastille de 3 mm de diamètre, impérativement en périphérie de la tache. Les six points de gamme sont à poinçonner en double. Déposer chaque pastille dans un puits d'une plaque 96 puits à fond rond (non fournie dans le kit). Ajouter 150 µL de tampon PBS par puits. Eluer au moins 16 heures (une nuit) entre +2°C et +8°C. On obtient alors six points de gamme : 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 et 0 µg/L.

Contrôles internes : Comme la gamme, les trois contrôles internes sont à poinçonner en double à partir du carton calibré proposé dans le kit, impérativement en périphérie de la tache (pastilles de 3 mm de diamètre). Déposer chaque pastille dans un puits d'une plaque 96 puits à fond rond (non fournie dans le kit). Ajouter 150 µL de tampon PBS par puits. Eluer au moins 16h (une nuit) entre +2°C et +8°C. La concentration en PAP dans les trois contrôles est respectivement de 1 µg/L (Low Control), 2 µg/L (Medium Control) et 3 µg/L (High Control).

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 embouts des micropipettes doivent absolument être changés entre chaque homogénéisation d'éluat d'échantillons, de points de gamme ou de contrôles.

Plaque de dosage : La plaque, sous vide, doit être équilibrée à température ambiante avant de l'extraire de son emballage aluminium. 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 (980 mL) le contenu entier du flacon de Tween 20 (10%) fourni et homogénéiser.

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 H₂SO₄ : Solution liquide prête à l'emploi après homogénéisation.

RÉALISATION DU DOSAGE

Une gamme de PAP est obtenue après élution, dans du PBS, des six concentrations standards fournies dans le kit. Elle comprend des solutions de concentration 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 et 0 µg/L, obtenues en double.

Chaque point de gamme, élué en double, est déposé, après homogénéisation, dans la plaque de dosage (100 µL/puits). Les embouts des micropipettes doivent absolument être changés entre chaque homogénéisation d'éluat de points de gamme.

Les deux puits qui recevront 100 µL du point à 0 µg/L permettront d'évaluer le bruit de fond du dosage.

Les éluats des taches des échantillons ainsi que les éluats des contrôles internes sont déposés, en double, après homogénéisation, dans la plaque de dosage (100 µL/puits). Les embouts des micropipettes doivent absolument être changés entre chaque homogénéisation d'éluat d'échantillons ou de contrôles.

Ces dépôts sont incubés 3 heures à température ambiante (+19°C à +22°C), la plaque étant au préalable couverte d'un adhésif.

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 couverte d'un adhésif à l'obscurité.

Après cette incubation, 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 contrôles et d'échantillons avant de calculer la moyenne des deux réplicats.

Le tableau ci-dessous est un exemple de résultats obtenus pour une gamme de référence avec une moyenne de bruit de fond d'une densité optique de 0,068 (donné à titre indicatif) :

| PAP (µg/L) | Absorbance (Densité Optique à 450 nm) | | | | |
|---------------|---------------------------------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------|
| | Réplicat 1 | Réplicat 2 | Réplicat 1 - moyenne bruit de fond | Réplicat 2 - moyenne bruit de fond | Moyenne |
| 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 |

La courbe standard est construite selon la fonction $[PAP] = f(\text{absorbance moyenne})$, 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 les éluats des taches (contrôles et échantillons) est calculée à l'aide de l'équation de la courbe ainsi construite.

Contrôle qualité

L'usage de contrôles internes est recommandé pour s'assurer de la validité des résultats. Les contrôles doivent être traités de la même façon que les échantillons. Trois contrôles correspondant à des concentrations croissantes de PAP (low, medium, high) sont fournis dans la trousse. Ces contrôles doivent être inclus dans chaque dosage : si le dosage du jour comprend plusieurs plaques, les contrôles devront être posés sur chaque plaque.

Il est recommandé que les contrôles ne dévient pas d'un écart de +/-20% par rapport à leur concentration théorique :

| Contrôle - Concentration théorique | Limite basse | Limite haute |
|------------------------------------|--------------|--------------|
| 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 |

Les résultats des échantillons ne doivent être validés que si les résultats des contrôles pour ce dosage satisfont aux critères 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 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 $[PAP] = f(\text{absorbance moyenne})$.

LIMITATIONS DU DOSAGE

L'information sur le dosage de PAP obtenue à l'aide du kit MucoPAPII 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 seconde, 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/.

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

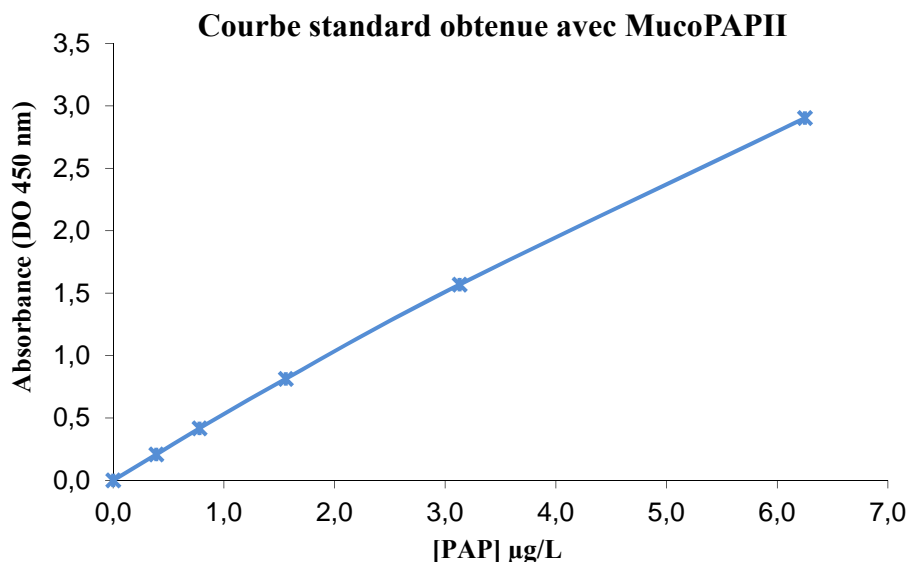
Chez les nouveau-nés ayant une TIR élevée (>50 µg/L), tous les enfants atteints de mucoviscidose ont une PAP > 1,5 µg/L (à l'exception des formes frustes et des bébés présentant un ileus méconial). Les nouveau-nés atteints représentent environ 25% des nouveau-nés ayant une TIR élevée et une PAP >1,5 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

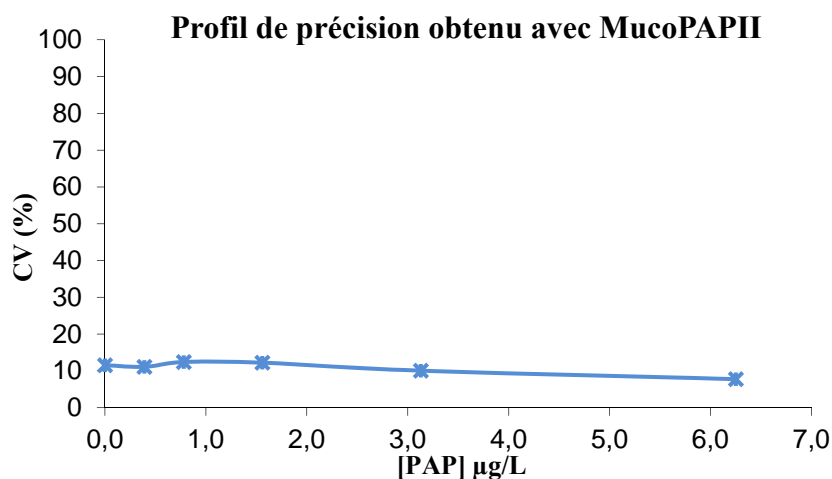
Toutes les données présentées ci-dessous ont été obtenues avec l'appareil Multiskan FC de la marque Thermofisher Scientific dont les caractéristiques sont :

- 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 MucoPAPII est représentée dans le graphique ci-dessous. Elle a été déterminée en utilisant quatre lots différents et en poinçonnant neuf fois les six points de gamme de chacun des lots.



Profil de précision : Le profil de précision du dispositif MucoPAPII a été établi en utilisant quatre lots différents et en poinçonnant neuf fois les six points de gamme de chacun des lots. Il est représenté ci-dessous.



Répétabilité et reproductibilité : La répétabilité et la reproductibilité du dispositif MucoPAPII ont été déterminées en utilisant cinq lots de kits différents et en poinçonnant neuf fois chacun des trois contrôles internes fournis dans chaque kit.

La répétabilité représente la variation intra-lot (n = 9) et la reproductibilité la variation inter-lot (n = 5).

| Valeur attendue du contrôle (µg/L) | Valeur obtenue (µg/L) | Répétabilité (CV en %) | Reproductibilité (CV en %) |
|------------------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|
| 1 | 1,044 | 12,1 | 12,3 |
| 2 | 2,075 | 10 | 10,8 |
| 3 | 3,134 | 8,2 | 8,5 |

Limites de détection et quantification : Les limites de détection et de quantification du dosage MucoPAPII (exprimées en microgrammes de PAP par litre de sang) sont respectivement de 0,084 µg/L et 0,143 µg/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 : Aucune réaction croisée obtenue dans le dosage MucoPAPII avec les molécules IL2, IL6, IFN γ , TNF α et les protéines d'*Escherichia coli*.

Effet crochet : Absence d'effet crochet jusqu'à la concentration en PAP de 1000 µg/L, exprimée en microgrammes 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 S.A. 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 S.A. 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^{ème} édition, 2021). Clinical and Laboratory Standards Institute.

RÉSUMÉ DU DOSAGE

Ne pas oublier de préparer les éluats des taches de sang en PBS (150 µL/well) 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. Après équilibration à température ambiante, sortir la plaque de dosage de son étui et y déposer, après homogénéisation, les éluats des taches de gamme, des trois contrôles et des échantillons (100 µL/puits).
3. Incuber 3 heures à température ambiante.
4. Finir de préparer le tampon de lavage (ajout du Tween dans le PBS préparé la veille).
5. A la fin de l'incubation de 3 heures, effectuer 5 lavages PBS/Tween, vider la plaque, sécher par tapotements.
6. Distribuer l'anticorps biotinylé (100 µL/puits).
7. Incuber 30 minutes à température ambiante.
8. Effectuer 5 lavages PBS/Tween, vider la plaque, sécher par tapotements.
9. Distribuer le conjugué avidine-peroxydase (100 µL/puits).
10. Incuber 15 minutes à température ambiante.
11. Effectuer 5 lavages PBS/Tween, vider la plaque, sécher par tapotements.
12. Distribuer le substrat chromogène TMB (100 µL/puits).
13. Incuber 15 minutes à température ambiante à l'obscurité.
14. Sans lavage, arrêter la réaction par ajout d'acide H₂SO₄ (100 µL/puits).
15. Lire l'absorbance à 450 nm.

NOTES