



IFU-MPK03-FR
Version 10
Dernière révision : 2022/05

MucoPAP-F

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

Brevet INSERM

Fluoroimmunos dosage en temps résolu
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 MPK03

IVD

CE

SYMBOLES



Pour usage diagnostique *in vitro*



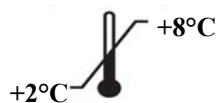
Numéro de lot



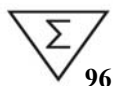
Numéro de catalogue



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.....	11
PERFORMANCES.....	11
CARACTÉRISTIQUES ANALYTIQUES.....	11
GARANTIE.....	12
RÉFÉRENCES	13
RÉSUMÉ DU DOSAGE.....	14

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-F 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 la technique de fluorescence en temps résolu (Time Resolved Fluorescence, TRF). 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 streptavidine-europium. Après une nouvelle étape de lavages, l'ajout d'une solution de développement de la fluorescence entraîne la rupture de la liaison entre streptavidine et europium puis la capture de l'europlum libéré dans des chélates hautement fluorescents. Ces chélates émettent à 620 nm après excitation à 337 nm. L'intensité de fluorescence 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
- Agitateur de plaques (orbital / 300 rpm = rotations par minute)
- Laveur de plaques (automatique ou semi-automatique)
- Spectrofluorimètre pour microplaques, équipé d'un filtre 337 nm pour l'excitation et d'un filtre 620 nm pour l'émission
- Ordinateur couplé au lecteur pour l'analyse des résultats
- Micropipettes automatiques mono- et multicanaux
- Contenant d'un litre (pour le 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
- Quatre réservoirs à réactif jetables à annoter (un par réactif): PBS, anticorps biotinylés, streptavidine-europium et solution de révélation
- 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 internes.

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 (16h) 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.
Tampon de dilution du conjugué		Flacon de 15 mL. A utiliser pour diluer au 1/1000 le conjugué streptavidine-europium.	Conserver entre +2°C et +8°C pendant 30 jours maximum.
Conjugué streptavidine-europium		Diluer au 1/1000 dans le tampon de dilution du conjugué. Préparer extemporanément le volume nécessaire.	Ne pas conserver la dilution au 1/1000 réalisée en tampon de dilution.
Solution de développement de la fluorescence (solution de révélation)		2 flacons de 11 mL chacun. Prête à l'emploi.	Conserver entre +2°C et +8°C pendant 30 jours maximum.
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.	

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

Telle que fournie par Dynabio S.A., la trousse de dosage MucoPAP-F 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	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	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
Tampon de dilution du conjugué	Solution saline à base de tampon Tris-HCl contenant des protéines bovines, détergent et agent antibactérien	/
Conjugué streptavidine-europium	Complexe d'euporium-streptavidine, en solution saline à base de tampon Tris-HCl contenant des agents protecteur et antibactérien	0,1 mg/mL
Solution de développement de la fluorescence	Solution contenant acide acétique, détergent et chélateurs	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
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). Si l'échantillon ne peut pas être directement appliqué sur le papier-filtre, ne pas utiliser du sang recueilli en présence de réactifs anticoagulants (EDTA, citrate) chélateurs de l'euporium, qui affecteraient les résultats du dosage.

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, 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, tampon de dilution, conjugué streptavidine-europium et solution de développement de la fluorescence. 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 (+19°C à +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 lyophilisé doit être préparé au moins 10 minutes à l'avance afin que sa dissolution soit totale et le réactif homogène.

La solution de développement de la fluorescence est un réactif thermolabile et doit impérativement être stockée entre +2°C et +8°C.

En cas d'endommagement de la trousse pendant le transport (flacons renversés et/ou cassés, 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'élution 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 2 endroits distincts sur une même tache de sang. Ajouter 150 µL de tampon PBS dans chaque puits. Eluer au moins 16h (une nuit) entre +2°C et +8°C.

Gamme de référence : Tout comme les échantillons à doser, découper 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 16h (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 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. 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 du flacon de Tween 20 (10%) fourni et bien homogénéiser le mélange.

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.

Tampon de dilution du conjugué : après homogénéisation, ce tampon est utilisé pour préparer la dilution 1/1000 du conjugué streptavidine-europium (voir ci-dessous).

Conjugué streptavidine-europium (0,1 mg/mL) : diluer ce conjugué au 1/1000 en tampon de dilution pour obtenir une concentration de 0,1 µg/mL. Le volume de conjugué dilué à préparer dépend du nombre de puits utilisé le jour même. Cette dilution doit être préparée extemporanément, pendant l'incubation de l'anticorps biotinylé dans les puits.

Solution de révélation : 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 pointes des micropipettes doivent impérativement être changées entre chaque dépôt de point de gamme homogénéisé. 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 de nouveau-nés ainsi que les éluats des contrôles internes sont déposés, en double, après homogénéisation, dans la plaque de dosage (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.

Ces dépôts sont incubés 3 heures à température ambiante (+19°C à +22°C), sous agitation (orbitale à 300 rpm), 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 0,1% préalablement préparé :

- Aspirer le contenu des puits,
- Remplir chaque puits avec ~300 µL de tampon de lavage
- Répéter ces deux premières 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 biotinyllés est immédiatement déposée (100 µL/puits) et incubée 30 minutes à température ambiante, sous agitation (orbitale à 300 rpm), la plaque étant couverte d'un adhésif.

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

La solution de conjugué streptavidine-europium dilué à 0,1 µg/mL en tampon de dilution est immédiatement ajoutée (100 µL/puits) et incubée 30 minutes à température ambiante sous agitation (orbitale à 300 rpm), la plaque étant couverte d'un adhésif.

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

La solution de révélation est ensuite ajoutée (**200 µL/puits**). Ne pas couvrir la plaque avec l'adhésif sous peine d'éteindre le signal.

Après 30 minutes d'incubation minimum sous agitation (orbitale à 300 rpm), la fluorescence est lue grâce à un spectrofluorimètre, en excitant à une longueur d'onde de 337 nm et en mesurant l'émission à 620 nm. La garantie d'un signal stable et précis ne peut être assurée que si la plaque est lue au moins 30 minutes après addition de la solution de révélation.

NB: le temps minimum d'incubation de la solution de révélation proposé dans ce protocole a été déterminé sur un lecteur Fluostar Omega (BMG Labtech) : voir détails de la configuration de cet appareil dans « CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES ».

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 de 4125 coups (donné à titre indicatif) :

PAP (µg/L)	Fluorescence				Moyenne
	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1 - moyenne bruit de fond	Réplicat 2 - moyenne bruit de fond	
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

La courbe standard est construite selon la fonction $[PAP] = f(\text{intensité moyenne de fluorescence})$, en faisant correspondre la fluorescence moyenne de chaque point de gamme à sa concentration théorique et en appliquant une régression linéaire. 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 $[PAP] = f(\text{intensité moyenne de fluorescence})$.

LIMITATIONS DU DOSAGE

L'information sur le dosage de PAP obtenue à l'aide du kit MucoPAP-F 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.

L'échantillon de sang ne doit pas contenir d'EDTA ou de citrate qui sont des chélateurs de l'euporium.

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/.

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

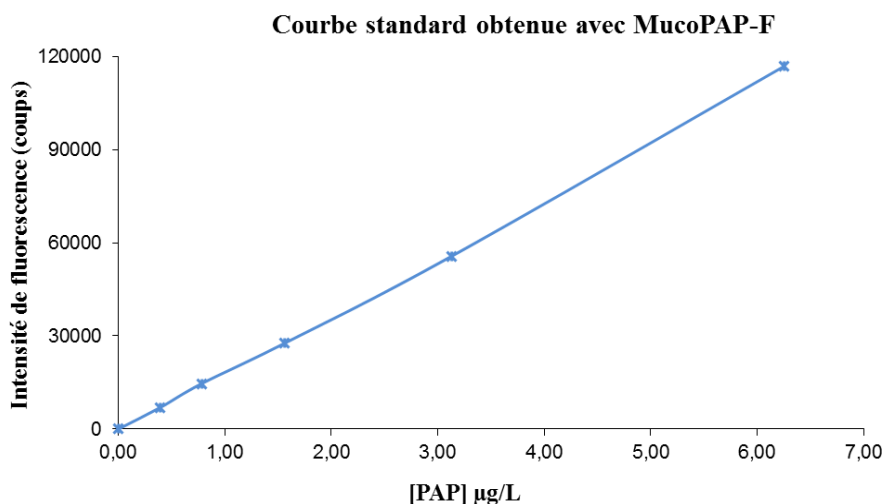
Chez les nouveau-nés ayant une valeur de TIR élevée ($> 50 \mu\text{g/L}$), tous les enfants atteints de mucoviscidose ont une PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$ (à l'exception des formes frustes et des bébés présentant un ileus méconial). Les nouveau-nés atteints représentent environ 25% des nouveau-nés ayant une valeur de TIR élevée et une PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$. 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, 7).

CARACTÉRISTIQUES ANALYTIQUES

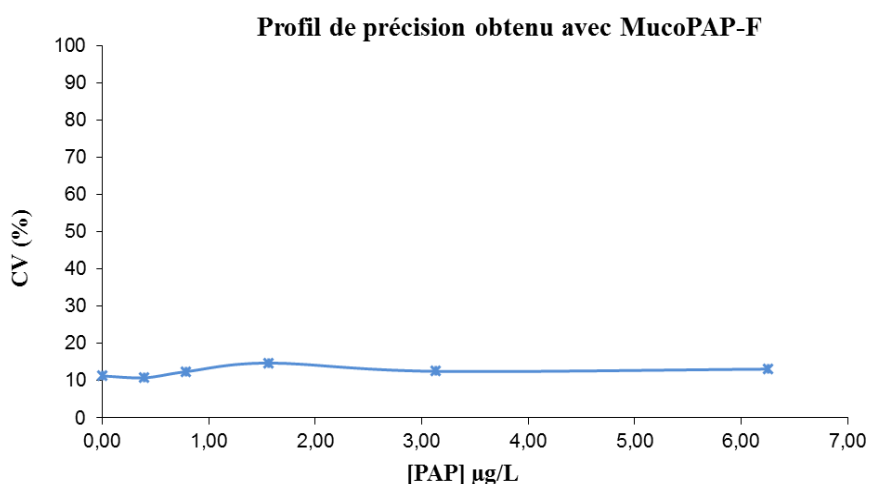
Toutes les données présentées ci-dessous ont été obtenues avec l'appareil Fluostar Omega de la marque BMG Labtech dont les caractéristiques sont :

- Mode de lecture : TRF (Time Resolved Fluorescence)
- Tête hyper sensible,
- Filtre d'excitation : 337 nm/ Filtre d'émission : 620 nm
- Intégration : 60 μs
- Durée : 400 μs
- Temps de pause avant le début de la lecture: 0,2 seconde
- Nombre de flashes par puits: 200

Courbe standard : Une courbe standard typique du dispositif MucoPAP-F est présentée dans le graphique ci-dessous. Elle a été définie en utilisant quatre lots différents et en poinçonnant neuf fois les six points de gamme dans chaque lot.



Profil de précision : Le profil de précision du dispositif MucoPAP-F a été déterminé en utilisant quatre lots différents et en poinçonnant neuf fois les six points de gamme dans chaque lot. Il est présenté dans le graphique ci-dessous.



Répétabilité et reproductibilité : La répétabilité et la reproductibilité du dispositif MucoPAP-F ont été déterminées en utilisant cinq lots de kits différents et en poinçonnant onze fois chacun des trois contrôles internes fournis dans chaque kit. La répétabilité représente la variation intra-lot (n = 11) et la reproductibilité la variation inter-lot (n = 5).

Valeur du contrôle attendu (µg/L)	Valeur obtenue (µg/L)	Répétabilité (CV en %)	Reproductibilité (CV en %)
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Limites de détection et quantification : Les limites de détection et de quantification du dosage MucoPAP-F (exprimées en microgrammes de PAP par litre de sang) sont respectivement de 0,24 µg/L et 0,32 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 MucoPAP-F 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.
7. Weidler *et al.* J. Cystic Fibrosis 2016;15:752-758.

RÉSUMÉ DU DOSAGE

Ne pas oublier de préparer les éluats des taches de sang 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. 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 3h à température ambiante sous agitation (orbitale à 300 rpm).
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 3h, effectuer 5 lavages PBS/Tween, vider la plaque, sécher par tapotements.
6. Distribuer l'anticorps biotinyté (100 µL/puits).
7. Incuber 30 min à température ambiante sous agitation (orbitale à 300 rpm).
8. Effectuer 5 lavages PBS/Tween, vider la plaque, sécher par tapotements.
9. Distribuer le conjugué streptavidine-europium (100 µL/puits).
10. Incuber 30 min à température ambiante sous agitation (orbitale à 300 rpm).
11. Effectuer 5 lavages PBS/Tween, vider la plaque, sécher par tapotements.
12. Distribuer la solution de révélation (200 µL/puits).
13. Incuber 30 min à température ambiante sous agitation (orbitale à 300 rpm).
14. Lire la fluorescence à 620 nm après excitation à 337 nm.

NOTES