IFU-MPK03-DE
Version 11
Letzte Überarbeitung: 2022/08

MucoPAP-F

PAP-Testkit für das Neugeborenenscreening auf Mukoviszidose

INSERM-Patent

Zeitaufgelöste Fluoroimmunoassays
Gebrauchsanweisung und Reagenzien für 96 Dosen

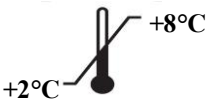
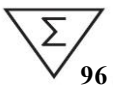
Hergestellt von:
DYNABIO S. A.
Luminy Biotech Entreprises
Case 922 - 163, avenue de Luminy
13288 Marseille cedex 9
France
Tel: +33 (0)4 86 94 85 04
www.dynabio.eu

REF **MPK03**

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**

ENTNAHME UND VERARBEITUNG VON PROBEN **6**

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN **7**

EMPFEHLUNGEN FÜR DIE NUTZUNG **7**

VORBEREITUNG DER PROBEN UND STANDARDS **8**

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN **8**

DURCHFÜHRUNG DER DOSIERUNG **9**

ERGEBNISBERECHNUNG **9**

Kalibrierung **9**

Qualitätskontrolle **10**

Analyse der Ergebnisse von Proben von Neugeborenen **10**

DOSIERUNGSBEGRENZUNGEN **11**

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE **11**

PERFORMANCE **11**

ANALYSEMERKMALE **11**

GARANTIE **13**

REFERENZEN **13**

DOSIERUNGSZUSAMMENFASSUNG **14**

EINLEITUNG

Das Pankreatitis-assoziierte Protein (PAP, auch Reg3A genannt) wird von der Bauchspeicheldrüse im Verlauf des Pankreasleidens synthetisiert. Bei Mukoviszidose ist die Bauchspeicheldrüse bereits *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 MucoPAP-F-Kit dient zur quantitativen Bestimmung von PAP in Blutproben von Neugeborenen, die auf kalibrierte und von den zuständigen Behörden zugelassene Screening-Kartons aufgetragen werden. Es handelt sich um einen Sandwich-Immunoassay, der die Technik der zeitaufgelösten Fluoreszenz (Time Resolved Fluorescence, TRF) 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 dem Waschen wird der Antigen-Antikörper-Komplex durch einen Streptavidin-Europium-Komplex nachgewiesen. Nach einem weiteren Waschschritt führt die Zugabe einer Fluoreszenzentwicklungslösung zum Aufbrechen der Bindung zwischen Streptavidin und Europium und anschließend zum Einfangen des freigesetzten Europiums in hochfluoreszierenden Chelaten. Diese Chelate emittieren bei 620 nm, nachdem sie bei 337 nm angeregt wurden. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist proportional zur Menge des im Ausgangseluat enthaltenen PAP.

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

Material :

- Vortex-Schüttler
- Plattenschüttler (orbital / 300 rpm = Umdrehungen pro Minute)
- Plattenwäscher (automatisch oder halbautomatisch)
- Spektrofluorimeter für Mikrotiterplatten, ausgestattet mit einem 337-nm-Filter für die Anregung und einem 620-nm-Filter für die Emission
- An das Lesegerät gekoppelter Computer zur Analyse der Ergebnisse
- Automatische Ein- und Mehrkanal-Mikropipetten
- 1-Liter-Behälter (für den 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
- Vier beschriftbare Einweg-Reagenzbehälter (einer pro Reagenz): PBS, biotinylierte Antikörper, Streptavidin-Europium und Entwicklungslösung
- 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 interne Kontrollen beinhalten.

<table>
<tr><th>REAGENZEN</th><th>KONSERVATION VOR DEM ÖFFNEN</th><th>MERKMALE DER NUTZUNG</th><th>KONSERVATION NACH DEM ÖFFNEN</th></tr>
<tr><td>Mikrotiterplatte
(96 Wells in horizontalen Streifen von 8 x 12 Wells)</td><td rowspan="3">In der Originalverpackung vor Licht geschützt aufbewahren zwischen +2°C und +8°C bis zum Verfallsdatum.</td><td>Mit Anti-PAP-Antikörpern beschichtet.
Gebrauchsfertig.</td><td rowspan="3">Bei +2°C bis +8°C in den dafür vorgesehenen Beuteln mit Trockenmittel bis zu 30 Tage lang aufbewahren.</td></tr>
<tr><td>Referenz-PAP-Bereich</td><td rowspan="2">Blutflecken auf kalibriertem Filterpapier, das gestanzt und in 150 µL PBS über Nacht (16h) zwischen +2°C und +8°C eluiert wird.</td></tr>
<tr><td>Interne Kontrollen</td></tr>
<tr><td>Biotinylierte Anti-PAP-Antikörper</td><td rowspan="6">Stabil zwischen +2°C und +8°C bis zum Verfallsdatum.</td><td>Lyophilisat in 11 mL destilliertem Wasser vorsichtig wieder aufnehmen, direkt in die Flasche.</td><td>Bei -20°C bis zu 30 Tage lang aufbewahren.</td></tr>
<tr><td>Konjugat-Verdünnungspuffer</td><td>15-mL-Flasche.
Zur Verwendung zur Verdünnung des Streptavidin-Europium-Konjugats im Verhältnis 1:1000.</td><td rowspan="2">Bei +2°C bis +8°C bis zu 30 Tage lang aufbewahren.

Die im Verdünnungspuffer hergestellte 1:1000-Verdünnung nicht aufbewahren.</td></tr>
<tr><td>Streptavidin-Europium-Konjugat</td><td>1:1000 mit dem Verdünnungspuffer des Konjugats verdünnen.
Bereiten Sie extemporiert das benötigte Volumen vor.</td></tr>
<tr><td>Lösung für die Entwicklung von Fluoreszenz (Entwicklerlösung)</td><td>2 Fläschchen mit je 11 mL
Gebrauchsfertig.</td><td>Bei +2°C bis +8°C bis zu 30 Tage lang aufbewahren.</td></tr>
<tr><td>PBS-Tablette</td><td>In 1 L destilliertem Wasser auflösen.
Reserviere 20 mL für die Elution der Blutflecken.</td><td rowspan="2">Bewahren Sie den vorbereiteten Waschpuffer bei -20°C bis zu 30 Tage lang auf.</td></tr>
<tr><td>Tween 20-Lösung</td><td>Gib zu den restlichen 980 mL PBS hinzu, um den Waschpuffer zu erhalten.</td></tr>
</table>

Unter diesen Bedingungen kann das Kit innerhalb von 30 Tagen nach dem Öffnen verwendet werden.

So wie er von Dynabio geliefert wird, ist der MucoPAP-F-Testkit 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 mit 2 Sätzen von 6 Flecken getrocknetem Blut, das mit PAP ergänzt wurde	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 Sätzen von 3 Flecken getrocknetem Blut, das mit PAP ergänzt wurde	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
Konjugat-Verdünnungspuffer	Tris-HCl-Puffer-Kochsalzlösung mit Rinderprotein, Detergens und antibakteriellem Wirkstoff	/
Streptavidin-Europium-Konjugat	Europium-Streptavidin-Komplex, in Tris-HCl-gepufferter Kochsalzlösung, die Schutzmittel und antibakterielle Mittel enthält	0,1 mg/mL
Lösung für die Entwicklung von Fluoreszenz	Lösung, die Essigsäure, Detergens und Chelatbildner enthält	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
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. Wenn die Probe nicht direkt auf das Filterpapier aufgebracht werden kann, darf kein Blut verwendet werden, das in Gegenwart von gerinnungshemmenden Reagenzien (EDTA, Citrat) gesammelt wurde, die Europium chelatieren, da dies die Testergebnisse beeinflussen würde.

Die Methode und die vollständige Vorrichtung zur Probenahme müssen den Vorschriften entsprechen.

Es wird empfohlen, die Vorschriften bezüglich des erforderlichen Probentyps und des angemessenen Zeitraums für die Probenerhebung nach dem geltenden Neugeborenenscreeningprogramm 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 Bluttropfen 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 Neugeborenenscreening 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-Puffer, Verdünnungspuffer, Streptavidin-Europium-Konjugat und Fluoreszenzentwicklungslösung. Vermeiden Sie den Kontakt mit der Haut, den Augen und den Schleimhäuten. Bei versehentlichem Kontakt gründlich mit 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 (+19°C bis +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 lyophilisierte biotinylierte Antikörper sollte mindestens 10 Minuten vor dem Test zubereitet werden, damit er sich vollständig auflöst und das Reagenz homogen ist.

Die Fluoreszenzentwicklungslösung ist ein thermolabiles Reagenz und muss unbedingt zwischen +2°C und +8°C gelagert werden.

Sollte das Kit während des Transports beschädigt worden sein (umgefallene und/oder zerbrochene Fläschchen, wieder aufgeblasene Aluminiumbeutel), wenden Sie sich bitte an Dynabio S. A. per E-Mail an info@dynabio.eu 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 durchtränkt 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 2 verschiedenen Stellen auf demselben Blutfleck. Geben Sie 150 µL PBS-Puffer in jede Vertiefung. Mindestens 16 h (über Nacht) bei +2°C bis +8°C eluieren.

Referenzsortiment: Genau wie bei den Dosierungsproben stanzen Sie aus den Sortimentskartons ein Pünktchen mit einem Durchmesser von 3 mm aus, das unbedingt am Rand des Flecks liegen muss. 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 16h (über Nacht) bei +2 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 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 Verdrängen homogenisiert werden. Die Mikropipettenspitzen müssen unbedingt zwischen jedem Auftrag von homogenisierten Sortiments-, Kontroll- oder Neugeborenenblutproben 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 Waschschritte aus ihrem Rahmen lösen.

Waschpuffer (PBS-0,1% Tween) : Gib zu der restlichen, am Vortag aufgelösten PBS (980 mL) den Inhalt der mitgelieferten Flasche mit Tween 20 (10%) und homogenisiere die Mischung gut.

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

Konjugat-Verdünnungspuffer: Nach dem Homogenisieren wird dieser Puffer zur Herstellung der 1:1000-Verdünnung des Streptavidin-Europium-Konjugats verwendet (siehe unten).

Streptavidin-Europium-Konjugat (0,1 mg/mL): Verdünnen Sie dieses Konjugat im Verhältnis 1:1000 in Verdünnungspuffer, um eine Konzentration von 0,1 µg/mL zu erhalten. Das Volumen des herzustellenden verdünnten Konjugats hängt von der Anzahl der am selben Tag verwendeten Vertiefungen ab. Diese Verdünnung muss extemporiert, während der Inkubation des biotinylierten Antikörpers in den Vertiefungen, hergestellt werden.

Entwicklerlösung: Nach dem Homogenisieren gebrauchsfertig.

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 Assayplatte gegeben (100 µL/Spitze). Die Mikropipettenspitzen müssen unbedingt zwischen den einzelnen homogenisierten Testpunkten gewechselt werden. Die beiden Vertiefungen, in die 100 µL des 0 µg/L-Punktes gegeben werden, dienen zur Bewertung des Hintergrundes des Assays.

Die Eluate der Flecken der Neugeborenenproben 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 jedem Auftrag der homogenisierten Kontrollpunkte oder Neugeborenenproben gewechselt werden.

Diese Ablagerungen werden 3 Stunden bei Raumtemperatur (+19°C bis +22°C) unter Schütteln (Orbital bei 300 rpm) inkubiert, wobei die Platte zuvor mit einem Klebstoff abgedeckt wurde.

Die Vertiefungen werden dann wie folgt fünfmal mit dem zuvor hergestellten Waschpuffer PBS/Tween 0,1% gewaschen:

- Den Inhalt der Vertiefungen absaugen,
- Fülle jedes Well mit ~300 µL Waschpuffer
- Wiederholen Sie die ersten beiden Schritte viermal,
- Nach dem letzten Waschgang entferne die Restflüssigkeit, indem du die Platte kräftig umdrehst (in einem Spülbecken oder Behälter für flüssige Abfälle) und 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 unter Schütteln (Orbital bei 300 rpm) inkubiert, wobei die Platte mit einem Klebstoff abgedeckt wird.

Die Platte wird wie oben beschrieben fünfmal gewaschen.

Die 0,1 µg/mL verdünnte Lösung des Streptavidin-Europium-Konjugats in Verdünnungspuffer wird sofort zugegeben (100 µL/Vertiefung) und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln (Orbital bei 300 rpm) inkubiert, wobei die Platte mit einem Klebstoff abgedeckt wird.

Die Platte wird wie oben beschrieben fünfmal gewaschen.

Anschließend wird die Entwicklerlösung hinzugefügt (**200 µL/Vertiefung**). Die Platte darf nicht mit dem Klebstoff abgedeckt werden, da sonst das Signal erlöschen würde.

Nach mindestens 30 Minuten Inkubation unter Schütteln (Orbital bei 300 rpm) wird die Fluoreszenz mit einem Spektrofluorimeter abgelesen, indem bei einer Wellenlänge von 337 nm angeregt und die Emission bei 620 nm gemessen wird. Ein stabiles und genaues Signal kann nur gewährleistet werden, wenn die Platte mindestens 30 Minuten nach Zugabe der Entwicklerlösung ausgelesen wird.

Hinweis: Die in diesem Protokoll vorgeschlagene minimale Inkubationszeit der Entwicklerlösung wurde auf einem Fluostar Omega Reader (BMG Labtech) ermittelt: siehe Details zur Konfiguration dieses Geräts unter "ANALYTISCHE MERKMALE".

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 Kontroll- und Probenreplikats abgezogen werden, bevor der Mittelwert der beiden Replikate berechnet wird.

Beispielergebnisse für eine Referenzreihe mit einem durchschnittlichen Hintergrundrauschen von 4125 Schlägen (nur zur Veranschaulichung):

	Fluoreszenz				
PAP (µg/L)	**Replikat 1**	**Replikat 2**	**Replikat 1 - durchschnittliches Hintergrundrauschen**	**Replikat 2 - durchschnittliches Hintergrundrauschen**	**Durchschnitt**
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

Die Standardkurve wird gemäß der Funktion [PAP] = f(mittlere Fluoreszenzintensität) konstruiert, indem die mittlere Fluoreszenz jedes Skalenpunktes seiner theoretischen Konzentration zugeordnet wird und eine lineare Regression angewendet wird. Die Verwendung eines Computerprogramms zur Berechnung dieser Funktion aus den Werten des Referenzbereichs wird empfohlen. Die PAP-Konzentration in den Eluaten 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 sollten in jedem Assay enthalten sein: Wenn der Assay des Tages mehrere Platten umfasst, sollten 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.eu 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(mittlere Fluoreszenzintensität) ermittelt.

DOSIERUNGSBEGRENZUNGEN

Die mit dem MucoPAP-F 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.

Die Blutprobe darf kein EDTA oder Citrat enthalten, die Chelatbildner für Europium sind.

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 Neugeborenenscreening auf Mukoviszidose durchgeführt wird, das eine PAP-Bestimmung beinhaltet.

PERFORMANCE

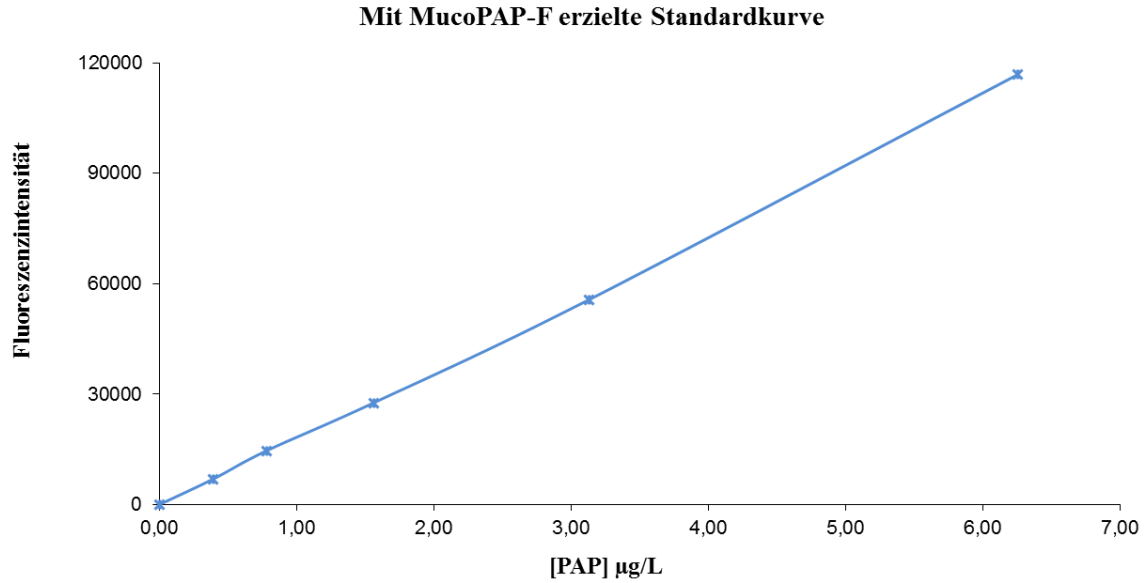
Bei Neugeborenen mit einem hohen IRT-Wert (>50 µg/L) haben alle Kinder mit Mukoviszidose einen PAP >1,75 µg/L (mit Ausnahme von frustranen Formen und Babys mit Mekoniumileus). Betroffene Neugeborene machen etwa 25% der Neugeborenen mit einem hohen IRT-Wert und einem PAP >1,75 µg/L aus. Unter den nicht betroffenen Neugeborenen in dieser Gruppe finden sich Frühgeborene, Babys mit Down-Syndrom sowie Babys mit schweren Infektionen des Verdauungssystems (4, 7).

ANALYSEMERKMALE

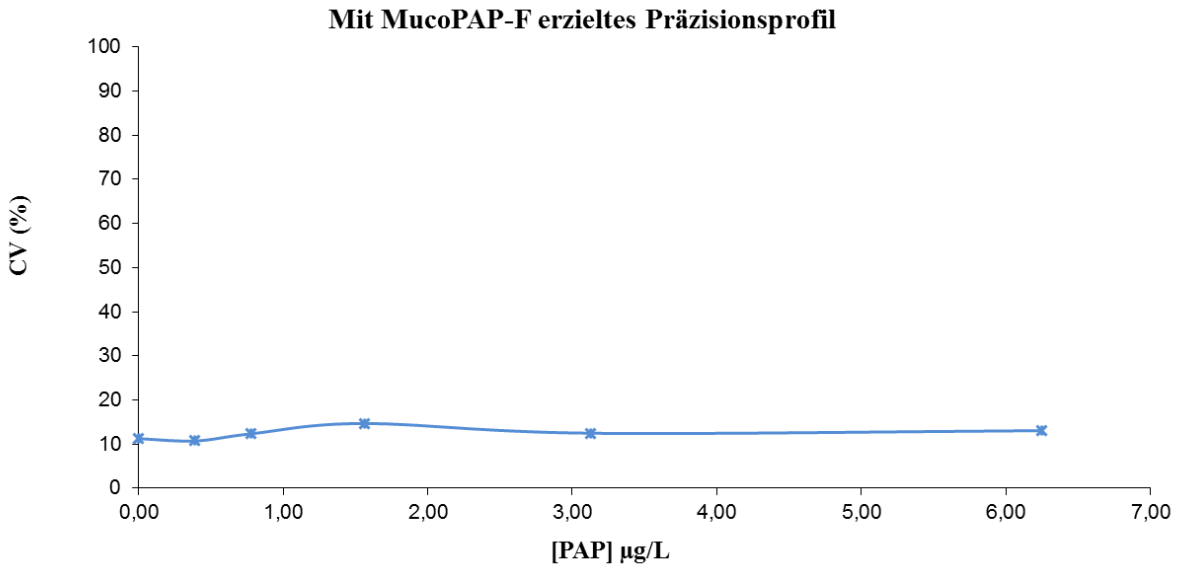
Alle nachfolgend aufgeführten Daten wurden mit dem Gerät Fluostar Omega der Marke BMG Labtech ermittelt, das folgende Merkmale aufweist:

- Lesemodus: TRF (Time Resolded Fluorescence)
- Überempfindliche Têtre,
- Anregungsfilter: 337 nm / Emissionsfilter: 620 nm
- Integration: 60 µs
- Dauer: 400 µs
- Pause bis zum Beginn der Wiedergabe: 0,2 Sekunden
- Anzahl der Blitze pro Schacht: 200

Standardkurve: Eine typische Standardkurve des MucoPAP-F-Geräts ist in der folgenden Grafik dargestellt. Sie wurde unter Verwendung von vier verschiedenen Chargen und durch neunmaliges Stanzen der sechs Skalenpunkte in jeder Charge definiert.



Genauigkeitsprofil: Das Genauigkeitsprofil des MucoPAP-F-Geräts wurde unter Verwendung von vier verschiedenen Chargen und durch neunmaliges Stanzen der sechs Skalenpunkte in jeder Charge ermittelt. Es ist in der folgenden Grafik dargestellt.



Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit: Die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit des MucoPAP-F Geräts wurde unter Verwendung von fünf verschiedenen Kit-Chargen und durch elfmaliges Stempeln jeder der drei internen Kontrollen, die in jedem Kit enthalten waren, bestimmt. Die Wiederholbarkeit repräsentiert die Variation innerhalb der Charge (n = 11) und die Reproduzierbarkeit die Variation zwischen den Chargen (n = 5).

Erwarteter Kontrollwert (µg/L)	Erhaltener Wert (µg/L)	Wiederholbarkeit (CV in %)	Reproduzierbarkeit (CV in %)
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen: Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen des MucoPAP-F-Assays (ausgedrückt in Mikrogramm PAP pro Liter Blut) betragen 0,24 µg/L bzw. 0,32 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: Im MucoPAP-F-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. Barthellemy *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, 7th edition, 2021). Clinical and Laboratory Standards Institute.
7. Weidler *et al.* J. Cystic Fibrosis 2016;15:752-758.

DOSIERUNGSZUSAMMENFASSUNG

Nicht vergessen, die Eluate der Blutflecken in 150 µL PBS/Vertiefungen vorzubereiten.
am Tag vor der Dosierung 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. 3h bei Raumtemperatur unter Schütteln (Orbital bei 300 rpm) 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, trocken klopfen.
6. Verteilen Sie den biotinylierten Antikörper (100 µL/Vertiefung).
7. 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln (Orbitale bei 300 rpm) inkubieren.
8. 5 PBS/Tween-Waschgänge durchführen, Platte leeren, abklopfen und trocknen.
9. Verteilen Sie das Streptavidin-Europium-Konjugat (100 µL/Vertiefung).
10. 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln (Orbitale bei 300 rpm) inkubieren.
11. 5 PBS/Tween-Waschgänge durchführen, Platte leeren, abklopfen und trocknen.
12. Verteilen Sie die Entwicklerlösung (200 µL/Vertiefung).
13. 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln (Orbitale bei 300 rpm) inkubieren.
14. Lesen Sie die Fluoreszenz bei 620 nm nach der Anregung bei 337 nm ab.

NOTES