



IFU-MPK03-NL
Versie 11
Laatste herziening: 2022/08

MucoPAP-F

PAP-testkit voor de opsporing van cystische fibrose bij pasgeborenen

INSERM octrooi

Tijd-resolved Fluoroimmunoassay

Instructies voor gebruik en reagentia voor 96 assays

Vervaardigd door :

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



SYMBOLLEN



Voor *in-vitro*diagnostisch gebruik



Partijnummer



Catalogusnummer



Vervaldatum (jjjj/mm/dd)



Bewaren tussen +2°C en +8°C



Bevat reagentia voor 96 assays



Opmerking: Lees de gebruiksaanwijzing



Fabrikant

SAMENVATTING

INLEIDING	4
PRINCIPE VAN DOSE RING.....	4
VOOR DE DOSERING BENODIGDE APPARATUUR EN PRODUCTEN DIE NIET WORDEN GELEVERD ...	4
SAMENSTELLING VAN DE KIT	5
BESCHRIJVING VAN REAGENTIA	6
MONSTERNEMING EN -VERWERKING	6
WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN	7
AANBEVELINGEN VOOR GEBRUIK.....	7
BEREIDING VAN MONSTERS EN STANDAARDS	8
BEREIDING VAN REAGENTIA	8
HET UITVOEREN VAN DE DOSE RING	9
BEREKENING VAN RESULTATEN	10
Kalibratie.....	10
Kwaliteitscontrole	10
Analyse van de resultaten van de neonatale monsters	10
DOSE RINGSBEPERKINGEN	10
INTERPRETATIE VAN RESULTATEN	11
PRESTATIES	11
ANALYTISCHE KENMERKEN	11
GARANTIE	13
REFERENTIES	13
SAMENVATTING VAN DE DOSE RING	14

INLEIDING

Pancreatitis-Associated Protein (PAP, ook bekend als Reg3A) wordt door de alvleesklier gesynthetiseerd tijdens het lijden aan de alvleesklier. Bij taaislijmziekte is de alvleesklier al *in de baarmoeder* aangetast en produceert hij PAP. Verschillende studies hebben aangetoond dat de concentratie van PAP verhoogd is in het bloed van getroffen pasgeborenen (1, 2, 3, 4, 5).

De PAP-test op de geijkte screeningkaarten kan dus pasgeborenen identificeren die waarschijnlijk cystische fibrose hebben.

PRINCIPE VAN DOSERING

De MucoPAP-F-kit is bedoeld voor de kwantitatieve bepaling van PAP in neonatale bloedmonsters die op gekalibreerde en goedgekeurde screeningskaarten zijn gedeponereerd. Het is een sandwich immunoassay waarbij gebruik wordt gemaakt van de Time Resolved Fluorescence (TRF) techniek. Het referentiebereik van de assay en de interne controles worden, net als de te testen monsters, aangeboden als bloedvlekjes op geijkte screeningskaarten.

De putjes van de microtiterplaat zijn gecoat met anti-PAP-antilichamen. De eluaten van de bloedvlekken worden in de putjes gedeponereerd en het daarin aanwezige PAP bindt zich aan de specifieke antilichamen. Eiwitten die zich niet binden, worden verwijderd door wassen. Vervolgens worden met biotine gelabelde anti-PAP-antilichamen aan de wells toegevoegd, die zich binden aan het geïmmobiliseerde PAP. Na het wassen wordt het antigeen-antilichaamcomplex gedetecteerd met een streptavidine-europiumcomplex. Na een verdere wasstap zorgt de toevoeging van een fluorescentie-ontwikkeloplossing ervoor dat de binding tussen streptavidine en europium wordt verbroken en dat het vrijgekomen europium wordt gevangen in sterk fluorescerende chelaten. Deze chelaten zenden uit bij 620 nm na excitatie bij 337 nm. De intensiteit van de fluorescentie-emissie is evenredig met de hoeveelheid PAP in het uitgangseluaat.

VOOR DE DOSERING BENODIGDE APPARATUUR EN PRODUCTEN DIE NIET WORDEN GELEVERD

Materiaal:

- Vortex-schudder
- Plaatschudder (orbitaal / 300 rpm = omwentelingen per minuut)
- Plaatwasmachine (automatisch of halfautomatisch)
- Spectrofluorimeter voor microtiterplaten, uitgerust met een 337 nm filter voor excitatie en een 620 nm filter voor emissie
- Computer gekoppeld aan de lezer voor analyse van de resultaten
- Automatische één- en meerkanaals micropipetten
- 1 liter vat (voor wasbuffer)
- Handmatige of automatische pons voor het snijden van filterpapierschijven met een diameter van 3 mm
- Twee liter gedestilleerd water

Apparatuur voor eenmalig gebruik :

- 96-wells ronde bodemplaat (voor de elutie van bloedvlekjes)
- Tips voor micropipetten
- 10 mL plastic pipetten
- Vier wegwerpverpakkingen voor annoteerreagentia (één per reagens): PBS, gebiotinyleerde antilichamen, streptavidine-europium en ontwikkelvloeistof
- Pasgeboren bloedvlekken op gekalibreerde, door de autoriteiten goedgekeurde screeningskaarten

SAMENSTELLING VAN DE KIT

Elke kit bevat reagentia voor 96 assays. De houdbaarheidsdatum staat op alle kit-etiketten.

De microtiterplaat wordt aangeboden in verwijderbare strips, zodat de assay kan worden aangepast aan het aantal te assayeren monsters. Elke assay moet echter een referentiebereik en interne controles omvatten.

REAGENTIA	CONSERVATIE VOOR DE OPENING	KENMERKEN GEBRUIK	CONSERVATIE NA DE OPENING
Microtiterplaat (96 putjes in horizontale stroken van 8 x 12 putjes)	In het donker bewaren in de originele verpakking tussen +2°C en +8°C tot de vervaldatum.	Gecoat met anti-PAP antilichamen. Klaar voor gebruik.	Bewaren bij +2°C tot +8°C, in de bijgeleverde droogzakjes, gedurende maximaal 30 dagen.
Referentiebereik van PAP's		Bloedvlekken op gekalibreerd filtreerpapier moeten worden geponst en geëluëerd in 150 µL PBS gedurende een nacht (16 uur) bij +2°C tot +8°C.	
Interne controles			
Gebiotinyleerde anti-PAP antilichamen	Stabiel tussen +2°C en +8°C tot de vervaldatum.	Lyofilisaat voorzichtig op te nemen in 11 mL gedestilleerd water, rechtstreeks in de flacon.	Bewaren bij -20°C, tot 30 dagen.
Conjugaat verdunningsbuffer		15 mL flesje. Gebruik om streptavidine- europiumconjugaat 1:1000 te verdunnen.	Bewaren tussen +2°C en +8°C gedurende maximaal 30 dagen.
Streptavidine-europium conjugaat		Verdun 1:1000 in de verdunningsbuffer van het conjugaat. Bereid het noodzakelijke volume extemporain voor.	Bewaar de 1:1000 verdunning niet in verdunningsbuffer.
Oplossing voor fluorescentieontwikkeling (openbaarmaking oplossing)		2 flesjes van 11 mL elk. Klaar voor gebruik.	Bewaren tussen +2°C en +8°C gedurende maximaal 30 dagen.
PBS tablet		Los op in 1 L gedestilleerd water. Zet 20 mL opzij voor de elutie van de bloedvlekken.	Bewaar de bereide wasbuffer bij -20°C gedurende maximaal 30 dagen.
Tween 20 oplossing		Voeg toe aan de resterende 980 mL PBS om de wasbuffer te maken.	

Onder deze omstandigheden kan de kit binnen 30 dagen na opening worden gebruikt.

De MucoPAP-F-assaykit van Dynabio S.A. is niet geautomatiseerd.

BESCHRIJVING VAN REAGENTIA

REAGENTIA	BESCHRIJVING	CONCENTRATIE VAN DE WERKZAME STOF
Microtiterplaat (96 putjes in horizontale stroken van 8 x 12 putjes)	Putjes gecoat met muisonoklonale antilichamen specifiek gericht tegen PAP	4 µg/mL
Referentiebereik van PAP's	Filtreerpapier met 2 sets van 6 gedroogde bloedvlekken, aangevuld met PAP	0 µg PAP/L bloed 0,39 µg PAP/L bloed 0,78 µg PAP/L bloed 1,56 µg PAP/L bloed 3.13 µg PAP/L bloed 6.25 µg PAP/L bloed
Interne controles	Filtreerpapier met 2 sets van 3 gedroogde bloedvlekken, aangevuld met PAP	Low: 1 µg PAP/L bloed Medium: 2 µg PAP/L bloed High: 3 µg PAP/L bloed
Gebiotinylerde anti-PAP antilichamen	Muis monoklonale antilichamen specifiek voor PAP, gekoppeld aan biotine, in fosfaatbuffer die beschermende middelen bevatten	0,25 µg/mL
Conjugaat verdunningsbuffer	Zoutoplossing op basis van Tris-HCl-buffer met rundereiwitten, detergent en antibacterieel middel	/
Streptavidine-europium conjugaat	Europium-streptavidinecomplex, in Tris-HCl gebufferde zoutoplossing die beschermende en antibacteriële stoffen bevat	0,1 mg/mL
Oplossing voor fluorescentieontwikkeling	Oplossing met azijnzuur, detergent en chelators	2-NTA 15 µM TOPO 50 µM
PBS tablet	Zout fosfaatbuffer	/
Tween 20	Geconcentreerde detergentoplossing	10%

MONSTERNEMING EN -VERWERKING

Bloedmonsters moeten worden genomen door middel van een hielprik en rechtstreeks worden verzameld op goedgekeurd filtreerpapier (referentiemethode). Als het monster niet rechtstreeks op het filtreerpapier kan worden aangebracht, gebruik dan geen bloed dat is afgenomen in aanwezigheid van europium-chelaatanticoagulerende reagentia (EDTA, citraat), die de testresultaten zullen beïnvloeden.

De methode en het volledige bemonsteringsapparaat moeten voldoen aan de voorschriften.

Het verdient aanbeveling de voorschriften te raadplegen betreffende het vereiste type monster en de passende periode voor monsterafname volgens het huidige programma voor screening van pasgeborenen. Deze laatste bepaalt ook het tijdsbestek voor de PAP-test na de monsterneming.

De resultaten van een test op basis van gedroogde bloedmonsters hangen rechtstreeks samen met de zorg die wordt besteed aan de verzameling, de behandeling, het vervoer en de opslag van de monsters. Documentatie (6) beschrijft nauwkeurig de methoden voor het nemen van monsters en de aanvaardbare technieken voor het aanbrengen van druppels of aliquots bloed op gestandaardiseerd filtreerpapier. Het bevat ook instructies over de juiste behandeling, het vervoer en de opslag van monsters om te zorgen voor kwaliteitsresultaten bij de screening van pasgeborenen.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

Deze kit mag alleen voor *in-vitro* diagnostische doeleinden worden gebruikt door speciaal opgeleid personeel met de juiste beschermingsmiddelen.

Gedroogde bloedvlekken van patiënten, reeksen en controles en gebiotinyleerde antilichamen bevatten bloedelementen van menselijke of dierlijke oorsprong: zij moeten als potentieel besmettelijk worden beschouwd en met de nodige voorzorgsmaatregelen ter bescherming van de gebruiker worden gehanteerd.

Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad van het apparaat voor verwijdering. Afval moet worden verwijderd in overeenstemming met de geldende voorschriften in het land van gebruik.

Niet in de mond pipetteren.

Niet eten, drinken of roken tijdens gebruik.

De volgende reagentia kunnen giftig of irriterend zijn: PBS, verdunningsbuffer, streptavidine-europiumconjugaat en fluorescentie-ontwikkelvloeistof. Aanraking met de huid, ogen en slijmvliezen vermijden. In geval van accidenteel contact, grondig spoelen met water.

Elk ernstig incident in verband met het hulpmiddel moet worden gemeld aan de fabrikant en aan de bevoegde autoriteit van de lidstaat waar de gebruiker en/of de patiënt is gevestigd

AANBEVELINGEN VOOR GEBRUIK

Stel een zorgvuldig te volgen plaatindeling op, waarbij de volgorde van afzetting in de wells van het bereik, de blanco, de controle- en neonaatmonsters wordt bepaald, om omkering van de stoten te voorkomen.

Vermijd biologische of chemische besmetting van monsters.

Gebruik geen reagentia waarvan de vervaldatum is verstreken.

Meng geen reagentia van verschillende batches.

Alle reagentia op kamertemperatuur brengen (+19°C tot +22°C) en schudden vóór gebruik.

Voorkom kruisbesmetting tussen verschillende reagentia: gebruik voor elk reagens een ander reservoir (reservoirs niet meegeleverd).

Houd u strikt aan de voor elke stap aangegeven incubatietijd.

De wasbeurten moeten zorgvuldig worden uitgevoerd om een toename van het achtergrondlawaai te voorkomen.

Laat de plaat nooit uitdrogen, want dat beïnvloedt de kwaliteit van de resultaten.

Het gelyofiliseerde gebiotinyleerde antilichaam moet ten minste 10 minuten van tevoren worden bereid om een volledige oplossing en homogeniteit van het reagens te garanderen.

De fluorescentie-ontwikkelvloeistof is een warmte-labiel reagens en moet tussen +2°C en +8°C worden bewaard.

In geval van schade aan de kit tijdens het transport (gemorste en/of gebroken flacons, opnieuw opgeblazen aluminium zakjes), gelieve contact op te nemen met Dynabio S.A. per e-mail op info@dynabio.eu of per telefoon op +33 (0)4 86 94 85 04.

BEREIDING VAN MONSTERS EN STANDAARDS

De dag voor de dosering:

Los het bijgeleverde PBS-tablet op in 1 L gedestilleerd water. Gebruik na volledige homogenisatie 20 mL voor de elutie van de bloedvlekken: de resterende 980 mL wordt bewaard bij +2°C tot +8°C tot de volgende dag, de dag van de bepaling, voor de bereiding van de wasbuffer.

Te testen monsters : *Snijd* een balletje met een diameter van 3 mm uit het karton op een plaats waar het bloed volledig in het karton is doorgedrongen, zonder overbelasting of dubbele afzetting. Plaats de pad in een well van een 96-well ronde bodemplaat (niet bijgeleverd in de kit). Om een duplobepaling te verkrijgen, wordt op 2 verschillende plaatsen op dezelfde bloedvlek geprikt. Voeg 150 µL PBS-buffer toe aan elk putje. Ten minste 16 uur (een nacht) bij +2°C tot +8°C elueren.

Referentiebereik: Snijd, zoals de te doseren monsters, een schijfje met een diameter van 3 mm uit de reekskarten, dwingend aan de omtrek van de vlek. De zes rangeerpunten moeten in tweevoud worden geponst. Plaats elk schijfje in een well van een 96-well-plaat met ronde bodem (niet meegeleverd in de kit). Voeg 150 µL PBS-buffer per well toe. Elueer gedurende ten minste 16 uur (een nacht) bij +2 tot +8 °C. Er worden zes bereikpunten verkregen: 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 en 0 µg/L.

Interne controles: De drie interne controles moeten, net als de reeks, in tweevoud worden geponst uit het in de kit bijgeleverde gekalibreerde karton, absoluut in de periferie van de vlek (pellets met een diameter van 3 mm). Plaats elk schijfje in een well van een 96-well-plaat met ronde bodem (niet meegeleverd in de kit). Voeg 150 µL PBS-buffer per well toe. Elueer gedurende ten minste 16 uur (een nacht) bij +2 tot +8 °C. De concentratie van PAP in de drie controles is respectievelijk 1 µg/L (Low Control), 2 µg/L (Medium Control) en 3 µg/L (High Control).

BEREIDING VAN REAGENTIA

Op de dag van de bepaling: Na deze incubatie gedurende één nacht moeten alle eluaten worden gehomogeniseerd door aspiratie en verplaatsing wanneer de te bepalen 100 µL wordt genomen. De punten van de micropipetten moeten worden verwisseld elke afzetting van gehomogeniseerde bloedmonsters uit de reeks, controlebloedmonsters of neonatale bloedmonsters.

Doseerplaat: De plaat, onder vacuüm, moet op kamertemperatuur worden uitgebalanceerd voordat zij uit de aluminium verpakking wordt genomen. Na opening moet de plaat door de gebruiker worden geïdentificeerd, zodat deze niet kan worden verward met een andere plaat die op dezelfde dag is verwerkt. Alle stroken van elke plaat moeten ook worden geïdentificeerd (A tot H) om te voorkomen dat ze worden verwisseld als ze tijdens de wasstappen van hun frame losraken.

Wasbuffer (PBS-0,1% Tween): Voeg aan de rest van de PBS die de vorige dag is opgelost (980 mL), de inhoud van het bijgeleverde flesje Tween 20 (10%) toe en meng goed.

Gebiotinyleerde antilichamen : Het lyofilisaat wordt voorzichtig opgenomen in 11 mL gedestilleerd water, rechtstreeks in de flacon. Het is klaar voor gebruik na volledige oplossing en homogenisatie.

Conjugaatverdunningsbuffer: Na homogenisatie wordt deze buffer gebruikt voor de bereiding van de 1:1000-verdunning van streptavidine-europiumconjugaat (zie hieronder).

Streptavidine-Europium Conjugaat (0,1 mg/mL): verdun dit conjugaat 1:1000 in verdunningsbuffer tot een concentratie van 0,1 µg/mL. Het volume verdund conjugaat dat moet worden bereid, hangt af van het aantal putjes dat op die dag wordt gebruikt. Deze verdunning moet extemporain worden bereid tijdens de incubatie van het gebiotinyleerde antilichaam in de putjes.

Ontwikkelingsoplossing: gebruiksklaar na homogenisatie.

HET UITVOEREN VAN DE DOSERING

Een PAP-bereik wordt verkregen na elutie in PBS van de zes standaardconcentraties die in de kit worden geleverd. Het bevat oplossingen van de concentratie 6,25 / 3,13 / 1,56 / 0,78 / 0,39 en 0 µg/L, verkregen in duplo.

Elk bereikpunt, in duplo geëluëerd, wordt na homogenisatie in het analyseplaatje gedeponereerd (100 µL per putje). De punten van de micropipetten moeten tussen elk gehomogeniseerd bereikpunt worden verwisseld. De twee putjes die 100 µL van de dot van 0 µg/L ontvangen, zullen worden gebruikt om de achtergrond van de bepaling te evalueren.

De eluaten van de neonatale spots en de eluaten van de interne controle worden in duplo toegevoegd aan de testplaat (100 µL per putje) na homogenisatie. De punten van de micropipetten moeten tussen elk gehomogeniseerd controle- of neonaatmonster worden verwisseld.

Deze afzettingen worden gedurende 3 uur geïncubeerd bij kamertemperatuur (+19°C tot +22°C), onder agitatie (orbitaal bij 300 omwentelingen per minuut), waarbij de plaat vooraf met een kleefmiddel wordt bedekt.

De wells worden vervolgens 5 keer gewassen als volgt, met de eerder bereide 0,1% PBS/Tween-wasbuffer:

- Zuig de inhoud van de putjes op,
- Vul elke well met ~300 µL wasbuffer
- Herhaal deze eerste twee stappen 4 keer,
- Verwijder na de laatste wasbeurt de achtergebleven vloeistof door de plaat krachtig om te keren (in een gootsteen of afvalbak) en vervolgens op een papieren handdoek te tikken.

NB: het gebruik van een automatische of halfautomatische wasmachine wordt aanbevolen.

De gebiotinyleerde antilichaamoplossing wordt onmiddellijk aangebracht (100 µL per putje) en gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd onder agitatie (orbitaal bij 300 omwentelingen per minuut) en de plaat wordt met kleefstof bedekt.

De plaat wordt 5 keer gewassen zoals hierboven beschreven.

Streptavidine-europiumconjugaatoplossing, verdund tot 0,1 µg/mL in verdunningsbuffer, wordt onmiddellijk toegevoegd (100 µL per putje) en gedurende 30 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur onder agitatie (orbitaal bij 300 omwentelingen per minuut), waarbij de plaat wordt afgedekt met een kleefmiddel.

De plaat wordt 5 keer gewassen zoals hierboven beschreven.

Vervolgens wordt de ontwikkelvloeistof toegevoegd (**200 µL per putje**). Bedek de plaat niet met de lijm, want dan kan het signaal doven.

Na ten minste 30 minuten incubatie onder agitatie (orbitaal bij 300 omwentelingen per minuut) wordt de fluorescentie afgelezen met een spectrofluorimeter, door op te wekken bij een golflengte van 337 nm en de emissie te meten bij 620 nm. Een stabiel en nauwkeurig signaal kan alleen worden gegarandeerd als de plaat ten minste 30 minuten na toevoeging van de ontwikkelvloeistof wordt afgelezen.

NB: de minimale incubatietijd van de in dit protocol voorgestelde revelatieoplossing is bepaald met een Fluostar Omega-lezer (BMG Labtech): zie de details van de configuratie van dit apparaat in "ANALYTISCHE CHARACTERISTIEKEN".

BEREKENING VAN RESULTATEN

Kalibratie

Voor elke uitgevoerde assay moet een standaardcurve worden gebruikt. Als de assay van de dag uit verschillende platen bestaat, moet het bereik op elke plaat worden geplaatst.

Om deze curve te verkrijgen moet de achtergrond van de bepaling eerst worden berekend als het gemiddelde van de voor de blanco (0 µg/L-punt) verkregen waarden en vervolgens worden afgetrokken van de ruwe resultaten die voor alle punten van het bereik zijn verkregen.

Deze achtergrond moet ook worden afgetrokken van het signaal van elk controle- en monsterreplicaat voordat het gemiddelde van de twee replicaten wordt berekend.

Voorbeeld van resultaten verkregen voor een referentiebereik met een gemiddelde achtergrond van 4125 tellingen (gegeven als indicatie):

PAP (µg/L)	Fluorescentie				
	Antwoord 1	Antwoord 2	Antwoord 1 - gemiddelde achtergrondruis	Antwoord 2 - gemiddelde achtergrondruis	Gemiddeld
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

De standaardcurve wordt geconstrueerd volgens de functie $[PAP] = f(\text{gemiddelde fluorescentie-intensiteit})$, door de gemiddelde fluorescentie van elk bereikpunt af te stemmen op de theoretische concentratie ervan en lineaire regressie toe te passen. Het gebruik van een computerprogramma om deze functie uit de waarden van het referentiebereik te berekenen, wordt aanbevolen. De PAP-concentratie in de eluaten van de spots (controles en monsters) wordt berekend met behulp van de vergelijking van de aldus geconstrueerde curve.

Kwaliteitscontrole

Het gebruik van interne controles wordt aanbevolen om de geldigheid van de resultaten te waarborgen. De controles moeten op dezelfde manier worden behandeld als de monsters. De kit bevat drie controles die overeenkomen met oplopende concentraties van PAP (low, medium, high). Deze controles moeten in elke assay worden opgenomen: als de assay van de dag uit verschillende platen bestaat, moeten de controles op elke plaat worden geplaatst.

Aanbevolen wordt dat de controles niet meer dan +/-20% van hun theoretische concentratie afwijken:

Controle - Theoretische concentratie	Lage limiet	Hoge limiet
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

Monsterresultaten mogen alleen gevalideerd worden als de controleresultaten voor die assay aan de aanvaardbaarheidscriteria voldoen.

In geval van terugkerende problemen of wijziging van de assayprestaties, gelieve contact op te nemen met Dynabio S.A. per e-mail op info@dynabio.eu of per telefoon op +33 (0)4 86 94 85 04.

Analyse van de resultaten van de neonatale monsters

Berekening van de PAP-concentratie in het bloed van pasgeborenen: als het hierboven beschreven protocol strikt wordt gevolgd en de monsters afkomstig zijn uit gekalibreerde screeningsboxen met een pondsiameter van 3 mm, wordt de PAP-bloedconcentratie voor elke pasgeborene rechtstreeks verkregen met de bereikcurvevergelijking $[PAP] = f(\text{gemiddelde fluorescentie-intensiteit})$

DOSERINGSBEPERKINGEN

De informatie over de PAP-test die met de MucoPAP-F-kit wordt verkregen, moet worden gebruikt als aanvulling op andere assays en tests (bv. IRT-assay) die als onderdeel van de cystische fibrose-screening worden uitgevoerd. Het moet worden geïnterpreteerd in het licht van andere beschikbare klinische informatie.

Omstandigheden die tot abnormale analyseresultaten kunnen leiden :

- de testkaart is niet gelijkmatig met bloed verzadigd,
- het monster was te dicht bij de rand van het bemonsteringsgebied gestoken,
- het monster in het midden van de vlek werd doorgesneden in plaats van aan de rand,
- het monster is verkeerd verzameld of gedroogd,
- het monster is blootgesteld aan warmte of vocht,
- het karton is vervuild met fecaliën.

Het bloedmonster mag geen EDTA of citraat bevatten, die chelators van europium zijn.

Zie ook de rubrieken "Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen" en "Aanbevelingen voor gebruik".

INTERPRETATIE VAN RESULTATEN

Beoordeling van de PAP-concentratie in bloedvlekken wordt gebruikt om een populatie van pasgeborenen met een hoog risico op cystische fibrose te identificeren. De huidige strategieën bestaan over het algemeen uit drie stappen. In de eerste stap wordt bij alle pasgeborenen immunoreactief trypsinogeen (IRT) bepaald. In het tweede geval wordt de PAP gemeten bij pasgeborenen met een hoge TIR. Bij pasgeborenen met een hoog TIR en PAP bestaat een derde stap uit ofwel een diagnostische test, de zweetest, ofwel een onderzoek naar mutaties in het CFTR-gen, eventueel gevolgd door een zweetest bij pasgeborenen met deze mutaties.

De Haute Autorité de Santé heeft in 2015 een exhaustieve evaluatie van de prestaties van de thans gebruikte strategieën uitgevoerd en gepubliceerd. Het is beschikbaar onder de titel "*Place de la stratégie couplant les dosages de la TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France*" op het volgende adres

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

Het verdient aanbeveling deze analyse te raadplegen alvorens een screening op cystic fibrosis bij pasgeborenen uit te voeren met een PAP-test.

PRESTATIES

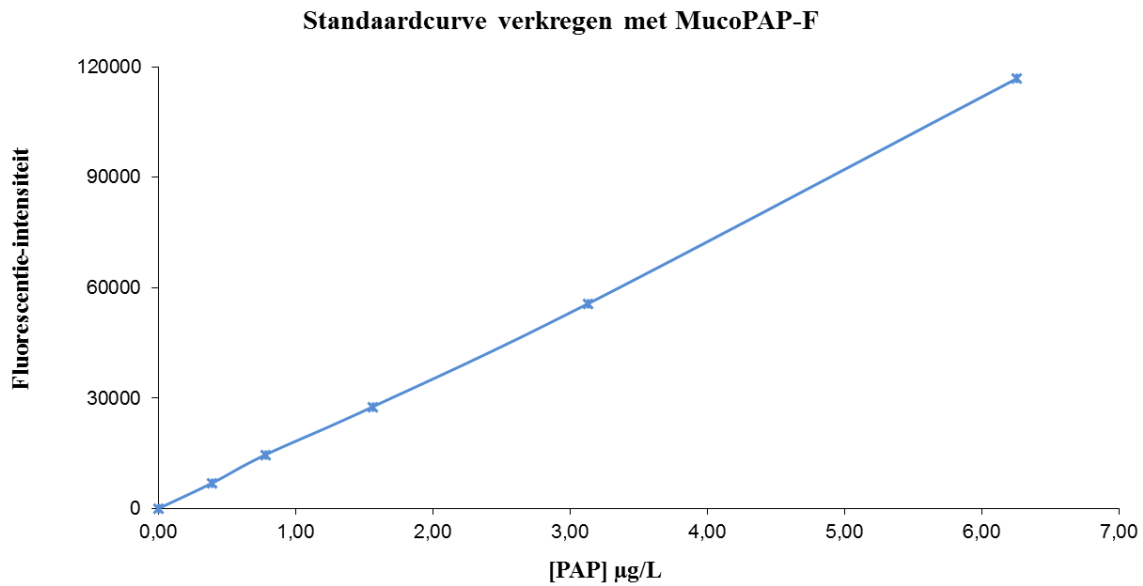
Bij pasgeborenen met een verhoogde TIR-waarde ($> 50 \mu\text{g/L}$), hebben alle kinderen met cystische fibrose een PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$ (met uitzondering van gefrustreerde vormen en baby's met meconium ileus). Ongeveer 25% van de pasgeborenen met een verhoogde IRT-waarde en een PAP $> 1,75 \mu\text{g/L}$ zijn aangetaste pasgeborenen. Niet-betrokken pasgeborenen in deze groep zijn premature kinderen, baby's met het syndroom van Down en baby's met ernstige GI-infecties (4, 7)

ANALYTISCHE KENMERKEN

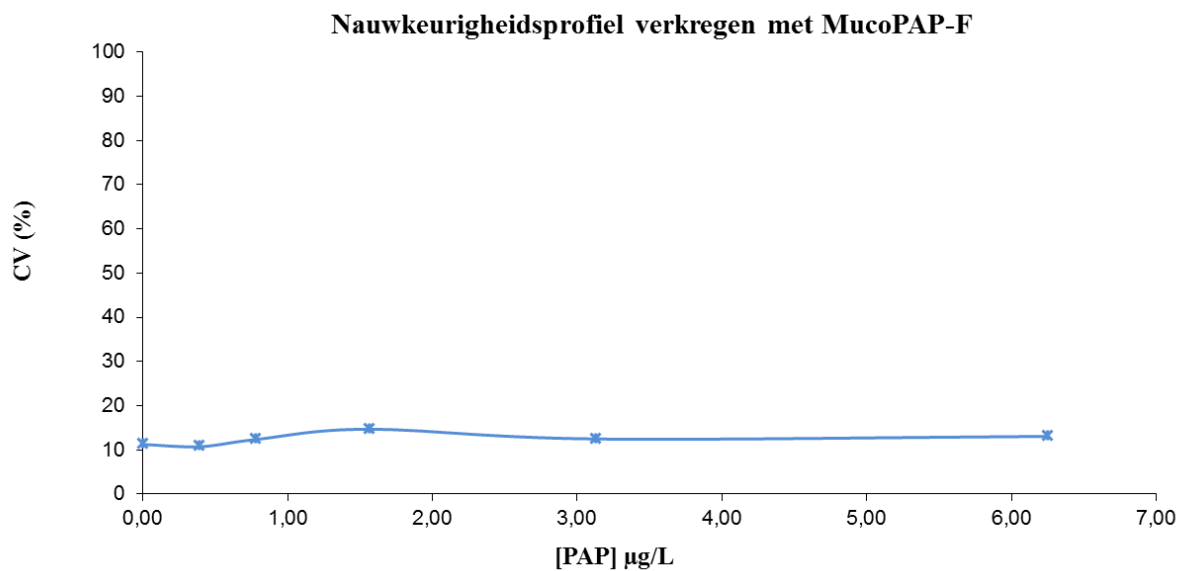
Alle hieronder vermelde gegevens werden verkregen met het Fluostar Omega toestel van BMG Labtech, waarvan de kenmerken als volgt zijn

- Wijze van aflezen: TRF (Time Resolved Fluorescence)
- Kan hypergevoelig zijn,
- Excitatiefilter: 337 nm/ Emissiefilter: 620 nm
- Integratie: 60 μs
- Duur: 400 μs
- Pauzetijd voordat de weergave begint: 0,2 seconden
- Aantal flitsen per putje: 200

Standaardcurve: Een typische standaardcurve voor het MucoPAP-F-apparaat is te zien in onderstaande grafiek. Het werd vastgesteld door vier verschillende batches te gebruiken en in elke batch de zes bereikpunten negen keer te ponsen.



Nauwkeurigheidsprofiel: Het nauwkeurigheidsprofiel van het MucoPAP-F-apparaat werd bepaald door vier verschillende batches te gebruiken en in elke batch de zes bereikpunten negen keer aan te prikken. Het wordt weergegeven in de onderstaande grafiek.



Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid: De herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van het MucopAP-F-apparaat werden bepaald aan de hand van vijf verschillende batches van de kit en door elk van de drie interne controles die in elke kit werden meegeleverd elf keer te ponsen. De herhaalbaarheid staat voor de variatie binnen de partij (n = 11) en de reproduceerbaarheid voor de variatie tussen de partijen (n = 5).

Verwachte controlewaarde (µg/L)	Verkregen waarde (µg/L)	Herhaalbaarheid (CV in %)	Reproduceerbaarheid (CV in %)
1	0,990	11,5	13,9
2	2,100	9,8	9,7
3	3,150	8,0	10,2

Aantoonbaarheids- en kwantificeringsgrenzen: De aantoonbaarheids- en kwantificeringsgrenzen van de MucopAP-F-test (uitgedrukt in microgram PAP per liter bloed) zijn respectievelijk 0,24 µg/L en 0,32 µg/L, ervan uitgaande dat :

- de aantoonbaarheidsgrens wordt gedefinieerd als 3 standaarddeviaties boven het gemiddelde van de nulstandaardmetingen
- De bepaalbaarheidsgrens wordt gedefinieerd als 10 standaarddeviaties boven het gemiddelde van de nulstandaardmetingen.

Kruisreactie: In de MucopAP-F-test werden geen kruisreacties verkregen met IL2-, IL6-, IFN-, TNF- en *Escherichia coli*-eiwitten.

Haakeffect: Geen haakeffect tot een PAP-concentratie van 1000 µg/L, uitgedrukt in microgram PAP per liter bloed.

GARANTIE

Elke wijziging of aanpassing van de door de fabrikant aanbevolen procedure kan van invloed zijn op de resultaten. In dit geval, Dynabio S.A. wijst elke aansprakelijkheid af, uitdrukkelijk, stilzwijgend of bij wet bepaald, met inbegrip van aansprakelijkheid die voortvloeit uit de verkoop of het vervoer van het product voor het gebruik ervan. In dit geval, Dynabio S.A. is niet aansprakelijk voor enige directe of indirecte schade die hieruit voortvloeit.

REFERENTIES

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. Barthelémy *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.
7. Weidler *et al.* J. Cystic Fibrosis 2016;15:752-758.

SAMENVATTING VAN DE DOSERING

Vergeet niet de bloedvlekkeluaten te bereiden in 150 μ L PBS/well de dag vóór de bepaling in een rondbodemplaat (niet bijgeleverd in de kit)

1. Breng de assay- en elutieplaten op kamertemperatuur.
2. Haal na equilibratie bij kamertemperatuur de assayplaat uit de doos en voeg de eluaten van de meetbereikspots, de drie controles en de monsters (100 μ L per putje) toe na homogenisatie.
3. Incubeer gedurende 3 uur bij kamertemperatuur onder agitatie (orbitaal bij 300 rpm).
4. Voltooi de bereiding van de wasbuffer (voeg Tween toe aan de PBS die de dag tevoren is bereid).
5. Na afloop van de 3 uur durende incubatie 5 keer PBS/Tween spoelen, de plaat leegmaken en droogdeppen.
6. Dispenseer gebiotinyleerd antilichaam (100 μ L per putje).
7. Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur onder schudden (orbitaal bij 300 omwentelingen per minuut).
8. 5 keer PBS/Tween spoelen, de plaat leegmaken en droogdeppen.
9. Dispenseer streptavidine-europiumconjugaat (100 μ L per putje).
10. Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur onder schudden (orbitaal bij 300 omwentelingen per minuut).
11. 5 keer PBS/Tween spoelen, de plaat leegmaken en droogdeppen.
12. Dispenseer de ontwikkelvloeistof (200 μ L per putje).
13. Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur onder schudden (orbitaal bij 300 omwentelingen per minuut).
14. Lees de fluorescentie af bij 620 nm na excitatie bij 337 nm.

OPMERKINGEN