



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Disposición

Número:

Referencia: 1-0047-3110-004870-23-0

VISTO el Expediente N° 1-0047-3110-004870-23-0 del Registro de esta Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), y:

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones Bodiagnóstico S.A. solicita se autorice la inscripción en el Registro Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de esta Administración Nacional, de un nuevo/s Producto/s Médico/s para diagnóstico in vitro, Nombre descriptivo: Reactivo para determinación de Proteína Asociada a Pancreatitis.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización .

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99 y normas complementarias.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorias.

Por ello;

LA ADMINISTRADORA NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL

DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico de uso in vitro, Nombre descriptivo: Reactivo para determinación de Proteína Asociada a Pancreatitis, de acuerdo con lo solicitado por Biodiagnóstico S.A. con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2024-35603322-APN-DVPCYAR#ANMAT .

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM 1201-381 ", con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTÍCULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- La vigencia del Certificado de Autorización será de cinco (5) años, a partir de la fecha de la presente disposición.

ARTÍCULO 6º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre descriptivo: Reactivo para determinación de Proteína Asociada a Pancreatitis

Marca comercial: Neonatal PAP Screening ELISA

Modelos:

Neonatal PAP Screening ELISA

Indicación/es de uso:

Neonatal PAP Screening ELISA es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de la proteína asociada a pancreatitis (PAP) en recién nacidos utilizando muestras de sangre seca en papel de filtro 903. Este kit se utiliza como medio para identificar recién nacidos que tienen un mayor riesgo de padecer fibrosis quística (FQ).

Forma de presentación: Kit para 192 determinaciones: 2x (12 tiras x 8 pocillos) contiene:

1. Placa de microtitulación recubierta: pocillos recubiertos con anticuerpos anti-PAP humana policlonales.
2. Calibradores y controles, manchas de sangre: bolsa de aluminio con los calibradores C0-C5 y los controles internos L1-L2 (manchas de sangre seca en papel de recogida de muestras 903®/226, utilizando una matriz humana que contiene una cantidad específica de PAP humana).
3. Solución de extracción: tampón listo para el uso con albúmina de suero bovino (BSA) y Tween® 20. Conservante: ProClin™ 300 0,05%.
4. Anti-PAP biotinilado: anticuerpo anti-PAP humano biotinilado liofilizado.
Rehidratar con 300 µL de agua destilada fresca y libre de gérmenes (agitar min. 15 min. con vórtex o rodillo). Diluir la solución concentrada 1:24 con el tampón de extracción, por ejemplo, 300 µL + 6900 µL = 7200 µL. Conservante: ProClin™ 300 0,015%..Estabilidad después de la reconstitución: 12 días a 2-8°C.
5. Conjugado enzimático: complejo estreptavidina-peroxidasa en una solución estabilizadora. Conservante: ProClin™ 300 0,05%. Listo para el uso. La conservación del conjugado a bajas temperaturas (2-8°C) puede provocar la formación de un precipitado blanco. Este precipitado se disuelve bajo agitación a temperatura ambiente.
6. Solución de lavado: Tampón de fosfato con detergente, concentrado x 10. Conservante: Timerosal 0,1%. Diluir la solución concentrada 1:10 con agua destilada o desionizada limpia y sin gérmenes, por ejemplo 55 ml + 495 ml = 550ml. La conservación de la solución de lavado concentrada a bajas temperaturas (2-8°C) puede provocar la formación de cristales. Estos cristales se disuelven mediante calentamiento (37°C) o dilución a la concentración de trabajo.
Estabilidad después de la dilución: 10 semanas a temperatura ambiente (20-25°C).
7. Sustrato cromogénico: TMB (3,3'-5,5' tetrametilbencidina). Listo para el uso.
8. Reactivo de bloqueo: H₂SO₄, 0,5M. Listo para el uso.

Período de vida útil y condición de conservación: 15 meses Conservación de 2-8°C

Nombre del fabricante:

ZenTech s.a.

Lugar de elaboración:

Liege Science Park, Avenue du Pre-Aily, 10,4031 Angleur
Belgica

Condición de uso: Uso profesional exclusivo
N° 1-0047-3110-004870-23-0

N° Identificador Trámite: 51751

AM

Digitally signed by PEARSON Enriqueta María
Date: 2024.04.26 19:08:15 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.04.26 19:08:16 -03:00



ZenTech

NEONATAL PAP Screening ELISA

E-LC-192

English (en)





Español (es)


Français (fr)

ZenTech s.a.

Liège Science Park - Avenue Pré Aily, 10 - 4031 ANGLEUR, Belgium
Tel. : + 32-(0)4-361.42.32 - Fax : + 32-(0)4-367.00.63

info@zentech.be
www.zentech.be

ISO15223	MEDICAL DEVICES SYMBOL	SÍMBOLO DE DISPOSITIVOS MÉDICOS	SYMBOLE DES DISPOSITIFS MÉDICAUX
	STORAGE TEMPERATURE LIMITATION	LÍMITES DE TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	LIMITES DE LA TEMPERATURE DE STOCKAGE
LOT	BATCH CODE	CÓDIGO DE LOTE	IDENTIFICATION DU LOT
	USE BY	UTILIZAR ANTES DE	DATE LIMITE D'UTILISATION
	CONSULT OPERATING INSTRUCTIONS	CONSULTAR LAS INSTRUCCIONES DE MANEJO O FUNCIONAMIENTO	CONSULTER LE MODE D'EMPLOI
IVD	IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE	DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO	DISPOSITIF DE DIAGNOSTIC IN VITRO
	MANUFACTURED BY	FABRICADO POR	FABRIQUE PAR
REF	CATALOGUE NUMBER	NÚMERO DE CATÁLOGO	REFERENCE CATALOGUE

	SYMBOLS (EDMA recommendations)	SÍMBOLOS (recomendaciones de la EDMA)	SYMBOLES (recommandations de l'EDMA)
	Number of determinations	Número de determinaciones	Nombre de déterminations
CAL CONTROL	Calibrators & controls (dried blood spots)	Calibradores y controles, manchas de sangre	Calibrateurs et contrôles (gouttes de sang séché)
SORB MTP	Coated microtiter plate	Placa de microtitulación recubierta	Microplaque coatée
EXTR SOLN	Extraction solution	Solución de extracción	Solution d'extraction
Ab BIOT RCNS 300µL H2O	Lyophilized biotinylated anti-PAP (to be reconstituted in water)	Anticuerpo anti-PAP biotinilado liofilizado (que se deberá reconstituir en agua)	Anti-PAP biotinylé lyophilisé (à reconstituer avec de l'eau)
CONJ HRP	Enzyme conjugate	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique
SUBS TMB	Chromogenic substrate	Sustrato cromogénico	Substrat chromogène
H₂SO₄ 0.5 M	Blocking reagent	Reactivo de bloqueo	Solution d'arrêt
BUF WASH 10X	Washing solution (to be diluted 10-fold)	Solución de lavado (que se deberá diluir 10 veces)	Solution de lavage (à diluer 10 fois)

ENGLISH

Enzyme immunoassay for the titration of Pancreatitis-Associated Protein from dried blood spots of neonates

E-LC-192 (192 determinations: 2x (12 strips x 8 wells))

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC (Professional use only)

1. INTENDED USE

The Neonatal PAP Screening ELISA from ZenTech is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of pancreatitis-associated protein (PAP) in neonates using blood spot samples dried on 903® filter paper. This kit is used as an aid in identifying newborns that are at increased risk of having cystic fibrosis (CF).

2. CLINICAL APPLICATIONS

The pancreatitis-associated protein (PAP), also known as Reg3A, is a 175 amino acids secretory protein which is a member of the regeneration family of C-type lectins.^{1,2} It is absent from the healthy pancreas but synthesized in high amounts after a sustained pancreatic stress. Studies on acute pancreatitis led to consider using the PAP blood concentration for cystic fibrosis screening.³

Cystic fibrosis, the most common lethal genetic disorder affecting Caucasian population (1/2,500 births), is a multi-system illness, most frequently characterized by a childhood chronic obstructive pulmonary disease, a pancreatic exocrine insufficiency, and abnormal sweat electrolyte concentrations. The CF diagnostic is based on a combination of the above clinical findings and/or a positive family history of the illness in conjunction with an abnormal sweat test.

As PAP is already synthesized *in utero* in the CF pancreas, neonates with CF have raised PAP blood concentration in the first days of life. Similar to immunoreactive trypsinogen (IRT), PAP elevation is not strictly specific to CF.^{5,6,7} It was demonstrated that all newborns with CF show an elevation of both IRT and PAP, whereas those without CF show normal results or an elevation of IRT or PAP, but rarely both.^{4,6,7} Thus, a dried blood spot assay for PAP has the potential to screen CF in neonates, in addition to an IRT assay.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The Neonatal PAP Screening ELISA is an enzyme immunoassay to quantitate the pancreatitis-associated protein (PAP) using dried blood spots.

The Neonatal PAP Screening ELISA is a sandwich ELISA. The wells are coated with an anti-PAP antibody that captures the PAP present in the sample. After an incubation and a washing step to remove the unbound material, a biotinylated anti-PAP antibody is added. After another incubation and a second washing step, a streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugate is added to the wells and binds to the biotin with high affinity. After a third incubation and another washing step, the immuno-complex is detected by the reduction of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) by the HRP. This reaction leads to a blue color development, which is directly proportional to the amount of antigen in the standard or in the sample. The enzymatic reaction is finally stopped by adding sulfuric acid and the absorbance at 450 nm is read using an ELISA microtiterplate reader.

4. REAGENTS PROVIDED WITH THE KIT

1. **Coated microtiterplates:** wells coated with polyclonal anti-human PAP antibodies.
2. **Calibrators and controls blood spots:** aluminum pouch with calibrators C0-C5 and internal controls L1-L2 (dried blood spots on 903® or 226 specimen collection paper using human matrix containing a specified amount of the human PAP).
3. **Extraction solution:** ready for use buffer with BSA and Tween® 20. Preservative: ProClin™ 300 0.05%.

4. **Biotinylated anti-PAP:** lyophilized biotinylated anti-human PAP antibody.
Rehydrate with 300 µL of fresh and germ-free distilled water (**shake min. 15 min. with vortex or rolling**). Dilute concentrated solution 1:24 with the extraction buffer, e.g. 300 µL + 6900 µL = 7200 µL. Preservative: ProClin™ 300 0.015%.
Stability after reconstitution: 12 days at 2-8°C.

The rinsing of the tube containing the antibody with the extraction buffer must be repeated several times to recover all material. This step is very important since poor rinsing will lead to poor results.

5. **Enzyme conjugate:** streptavidin-peroxidase complex in a stabilizing solution. Preservative: ProClin™ 300 0.05%. Ready for use. Conservation of the conjugate solution at low temperatures (2-8°C) may lead to the formation of a white precipitate. This precipitate dissolves under shaking at room temperature (RT).
6. **Washing solution:** 10x concentrated phosphate buffer with detergent. Preservative: Thimerosal 0.1%.
Dilute concentrated solution 1:10 with fresh and germ free distilled or deionized water, e.g. 55 mL + 495 mL = 550 mL. Conservation of the concentrated washing solution at low temperatures (2-8°C) may lead to crystals formation. These crystals dissolve upon heating (37°C) or dilution to the working concentration. Stability after dilution: 10 weeks at RT (20-25° C).
7. **Chromogenic substrate:** TMB (3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine). Ready for use.
8. **Blocking reagent:** H₂SO₄, 0.5M. Ready for use.

Reagents	Quantity 192 tests	Physical state
Wells	2 x (12 x 8)	Ready for use
Calibrators 0-5 Controls 1-2	1 aluminum pouch	Dried blood spots
Extraction solution	1 x 55 mL	Ready for use
Biotinylated anti-PAP	4 vials	Lyophilized
Enzyme conjugate	1 x 28 mL	Ready for use
Washing solution	3 x 55 mL	10x concentrated
Chromogenic substrate	1 x 25 mL	Ready for use
Blocking reagent	1 x 28 mL	Ready for use

Additional chromogenic solution, blocking reagent and washing solution could be ordered for automated procedure using reference: E-LI-000: Newborn Screening Extra Reagents

5. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

- **Keep dried blood spots at -20°C in the original bag containing a desiccant.** Care should be taken to seal it tightly.
- Store the kit and all other reagents at 2-8°C in closed containers when not in use but allow all reagents to stabilize at room temperature before use.
- Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil pouch has been opened, care should be taken to seal it tightly again.
- Unopened reagents will retain reactivity until expiration date shown on the label. Do not use reagents beyond this date.
- When opened and stored, reagents will retain reactivity two months.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Single or multichannel automatic pipettes to deliver volumes in the range of 10 to 1000 µL with an accuracy of ± 1.5% over the range 10-100 µL.
- Sealing tapes.
- For manual use, a microtiter plate reader capable of reading absorbance at 450 nm and 630 nm.
- A hole-puncher which produces 3.0 mm or 3.2 mm (1/8") discs

- A microtiterplate shaker (**900 rpm or 15 Hz – 300 rpm or 5Hz**).

$$\text{rpm} = \sqrt{\frac{\text{RCF}}{r \times 1.118}} \times 10^3$$

Where *r* is the orbital radius in mm (check the specifications of your device and, if necessary, divide the diameter by two).

RCF = 0,35g

- Blood collection cards. The minimum pre-printed information required is:

- *infant's name*
- *mother's name*
- *patient ID number*
- *date of birth*
- *sex*
- *specimen collection date*
- *submitter's identity and address*
- *physician's name and telephone number*
- *manufacturer and lot number of filter paper.*

Filter paper should be 903® or 226

7. WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic only.

In order to avoid personal and environmental contamination, the following precautions must be observed:

- Use disposable gloves while handling potentially infectious material and performing the assay.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics during the assay.
- All material of human origin used for the preparation of this kit is tested negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV. Since no test at present can guarantee complete absence of these viruses, all samples and reagents used for the assay must be considered potentially infectious; therefore, the assay waste must be decontaminated and disposed of, in accordance with established safety procedures. Disposable ignitable material must be incinerated; disposable non-ignitable material must be sterilized in autoclave for at least 1 hour at 121°C. Liquid waste must be added with sodium hypochlorite at a final concentration of 3%. The hypochlorite treatment should last for at least 30 minutes. Liquid waste containing acid must be neutralized with appropriate amounts of base before treating with sodium hypochlorite.
- Avoid splashing and aerosol formation; in case of spilling, wash carefully with a 3% sodium hypochlorite solution and dispose of this cleaning liquid as potentially infectious waste.
- Chromogenic substrate and blocking reagent solutions should be handled with care. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. In case of accident, rinse thoroughly with running water.
- Washing solution contains thimerosal.
- Extraction solution, biotinylated anti-PAP and enzyme conjugate contain ProClin™ 300 (H315/H317/H318/H410). This product is highly toxic by inhalation, swallowing and contact with skin. Keep away from food and drink.
- Blocking reagent contains sulfuric acid (4.9% w/w) (H331/H314/H315)
- Wear protective clothes and gloves. In case of contact with skin or eyes, rinse thoroughly with water. In case of accident, consult immediately a physician and show him/her the product label.

Risk phrases:

- H314 causes severe skin burns and eye damage
- H315 causes skin irritation
- H317 may cause an allergic skin reaction
- H318 causes serious eye damages
- H331 toxic if inhaled
- H410 very toxic to aquatic life with long lasting effects

In order to obtain reproducible results, the following rules must be observed:

- **Using a multichannel automatic pipette is better to ensure good results**
- **Avoid any contact between the tip and the side of wells. To avoid any degradation of the active phase.**

- Do not mix reagents from different lot numbers or from other manufacturers.
- Do not freeze kits.
- Strict compliance to the specific time and temperature of incubations is recommended for accurate results.
- Allow the microtiter plate strips and reagents to stabilize at room temperature before opening and using them.
- Do not use reagents after their expiration dates.
- Incomplete or inefficient washing will cause poor precision and high background.
- Use thoroughly clean glassware, free from contamination of metal ions or oxidizing substances.
- Use distilled water, stored in clean containers.
- Microbial contaminated serum or specimens containing heavy, visible particles should not be used.
- Cross contaminations of reagents or samples could cause false results. Use a clear, fresh, disposable pipette tip for each reagent of specimen manipulation.
- Do not expose the chromogenic substrate to light during storage or incubation.
- Follow exact incubation times. Dispense chromogenic substrate and blocking reagent solutions in no more than 3-4 minutes; dispense the two reagents in the same sequence.
- Traces of hypochlorite of soda can destroy many reagents biological activity.

A variety of factors influence the assay performances. These include the accuracy and reproducibility of pipetting technique, the photometer used or the timing bias during the assay.

8. SPECIMEN COLLECTION

Blood should ideally be collected between the second and the third day of life (48 to 72 hours after birth) as there is an age-related increase in PAP levels. A specimen collection after 168 hours could lead to false-positive results.⁸

Collect blood from the infant's heel only using the medial (closest to body center line) or lateral (furthest from body center line) portion of the plantar (walking) surface. Blood collection from another area of the infant foot, e.g. arch, may result in nerve, tendon or cartilage injury.

Fill out the required information on the blood collection form or card (see section 6).

To increase local blood flow, warm the skin puncture site using a warm moist towel (<42°C) applied to the site for 2-3 minutes. Similarly, holding the infant's limb below the level of the heart will increase the venous flow.

Clean the skin with 70% (v/v) isopropyl alcohol. Wipe dry with a sterile gauze and allow the skin to air dry.

Puncture the heel with a sterile lancet (2.4-2.5 mm long) or with an automatic lancet device. Wipe away the first drop of blood with a sterile gauze.

Gently touch one side of the filter paper against a large drop of blood and, in one step, allow a sufficient quantity of blood to soak into the paper to completely fill the preprinted circle. Ensure that the blood has penetrated and saturated the paper by examining both sides of the paper. Repeat the procedure to fill the required number of preprinted circles on the specimen collection card.

Do not milk or squeeze the puncture site during collection as it may cause hemolysis or dilution of the blood with tissue fluids.

Do not apply successive drops of blood to the same preprinted circle. If the blood flow diminishes before the complete fill of the preprinted repeat the sampling in a new circle.

Do not touch or smear the blood spots.

Cord blood shall not be used as a sample.

The sample is then air-dried for 4 hours at room temperature and stored in sealed paper envelopes or containers that will provide protection from moisture, light, heat and contact with other materials. Arrange transport of the collection card to the screening laboratory within 24 hours of collection.

The receiving laboratory should store the samples at 2-8°C for short-term storage in a moisture-proof environment protected from direct light. For long-term storage, samples should be stored at below -20°C in a moisture-proof environment.

The sample discs should be punched from similar areas on each individual blood spot. Do not punch sample discs from areas that include printed marks or that are near the edges of the blood spot.

9. ASSAY PROCEDURE

The results reliability depends on strict adherence to the described procedure.

Suggested assay plate layout (included only as a guide).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C0	C0	Smp									
B	C1	C1										
C	C2	C2										
D	C3	C3										
E	C4	C4										
F	C5	C5										
G	L1	L1										
H	L2	L2										

Manual procedure:

Sample preparation

- Bring all reagents and samples to room temperature before use. Gently mix the reagents for at least 15 minutes to homogenize them.
- Select the required number of microtiter strips and place them in the strip holder, taking account of the number of calibrators C0-C5, controls L1-L2 and samples to be assayed. It is recommended to analyze the calibrators and controls in duplicate.
- Following the suggested plate layout, punch 3.0 mm or 1/8" diameter blood spots from the calibrators (C0 to C5) and controls (L1 and L2) into their respective wells. Punch patient specimens into the remaining individual wells, noting the position of each patient sample on the plate. Spots should be punched in the center of the discs.

Do not autoclave calibrators, internal controls or patients' samples prior to punching.

PAP extraction

- Add 100 µL of extraction solution to each well.

Each well should be visually examined to ensure the blood spots are completely immersed in the solution.

Cover wells with a sealing tape to prevent evaporation.

- Incubate the plate for 1h15 at 37°C on a microtiter plate shaker at **900 rpm**. (see section 6) Ensure by periodic visual inspection that each disc is fully immersed in the extraction solution.
- During this incubation, prepare the working washing solution and the biotinylated anti-PAP solution (See section 4).

- After incubation, empty all wells completely by plate inversion. Ensure that all blood spots are discarded.**

A video of an appropriate elimination of biological samples is available:

https://youtu.be/ozS_ADEVnJE.



- Wash each well 3 times with 350 µL of diluted washing solution. **A soft flushing rate is required for good results (dispensing rate of 100 µL/s is recommended).**

After each washing step, ensure that all the wells are empty (remaining liquid < 15 µL). After the last washing, carefully remove remaining fluid by tapping the strips on tissue paper prior to next step. **Be sure to set up the washer. Please note that incomplete or inefficient washing will cause poor precision and high background.**

Immuno-complex formation

- Add 100 µL of the diluted biotinylated anti-PAP solution to each well.
- Cover wells with a sealing tape.
- Incubate for 2h at 37°C on a microtiter plate shaker (the recommended speed is **300 rpm**).
- After the incubation, repeat washing as described above.

Amplification reaction

- Add 100 µL of the ready for use enzyme conjugate to each well.
- Cover wells with a sealing tape.
- Incubate for 20 min at room temperature (15-30°C) on a microtiter plate shaker (the recommended speed is **300 rpm**).
- After the incubation, repeat washing as described above.

Color generation

- Dispense 100 µL of the chromogenic substrate to each well.
- Incubate for 15 minutes at room temperature (15-30°C) keeping the plate away from light, without shaking.
- After the incubation, stop the enzymatic reaction by adding 100 µL of the blocking reagent to each well.

Plate reading

- Measure the absorbance at 450 nm. Dual wavelength reading using 630 nm as reference wavelength is recommended but not compulsory.

Absorbance should be read within 20 minutes after completing the assay.

Wells Reagents	Calibrator (C0-C5)	Control (L1-L2)	Samples
Calibrators	1 x 3.0mm	----	----
Controls	----	1 x 3.0mm	----
Samples	----	----	1 x 3.0mm
Extraction solution	100 µL	100 µL	100 µL
- Cover the plate and elute for 1h15 at 900 rpm and 37°C - Aspirate and wash 3 x 350 µL			
Biotinylated anti-PAP	100 µL	100 µL	100 µL
- Cover the plate and incubate for 2h at 300 rpm and 37°C - Aspirate and wash 3 x 350 µL			
Enzyme conjugate	100 µL	100 µL	100 µL
- Cover the plate and incubate for 20 min at 300 rpm and RT - Aspirate and wash 3 x 350 µL			
Chrom. substrate	100 µL	100 µL	100 µL
- Cover the plate and incubate for 15 min at RT away from light			
Blocking reagent	100 µL	100 µL	100 µL
- Read: 450 nm and 630 nm as reference			

Automate procedure: Timing on automate: 4h30

Prepare the samples following the instructions given in the manual procedure (See section sample preparation).

Prepare the working washing solution and biotinylated anti-PAP (See section 4).

The automate procedure follows the protocol provided with the machine.

Be careful that the punches will have to be manually removed from the microtiter plate after the first incubation.

Additional chromogenic substrate, blocking reagent and washing solution could be ordered for automated procedure using reference:

E-LI-000: Newborn Screening Extra Reagents.

10. CALCULATION OF RESULTS

Titration curve

CHECK THE ACCURATE VALUES OF THE CALIBRATORS AND CONTROLS ON THE INSERT IN THE BOX OF EACH LOT.

The PAP amount in the patient's sample is calculated from a standard curve prepared from a known amount of human PAP calibrated by an in-house method. Currently, no standardized reference material is available for PAP.

The standard curve may change between lots. **The label on the current lot of calibrators and controls should be consulted for calibration values to be used in calculations.**

PAP concentration values are expressed in µg/L.

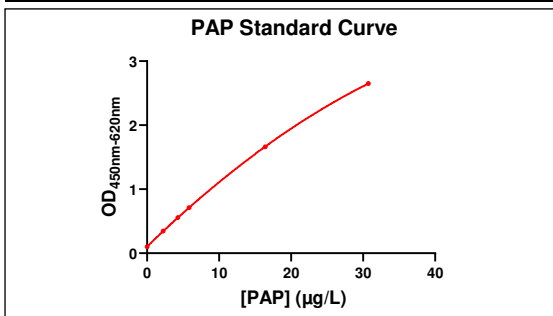
Use a quadratic regression curve to calculate the results after averaging the absorbance duplicates (if applicable).

- X-axis: use concentration on linear way
- Y-axis: use optical density on linear way

Results of a typical assay are shown below. **This curve is for illustration only and shall not be used to calculate patients' results.**

The maximum concentration that can be reported is limited by the linear performance characteristics of the photometer used. If the OD value of the highest calibrator is above the range of the photometer, then this calibrator must be omitted from the plot of the calibrator curve. Similarly, any sample measuring above the range of the microplate reader should be simply noted as greater than the highest acceptable calibrator or must be dilute.

Calibrator	[PAP] µg/L	OD 450nm
Cal 0	0	0.101
Cal 1	2.2	0.346
Cal 2	4.3	0.559
Cal 3	5.8	0.712
Cal 4	16.4	1.662
Cal 5	30.7	2.649



11. QUALITY CONTROL

Internal controls (L1-L2) included in the kit should be routinely monitored to check that measured concentrations are within the stated values. These controls provide valuable information regarding the validity of the test according to manufacturer specifications.

12. SUGGESTED NORMAL RANGE

In order to estimate normal range and cut-off values, 1,383 dried blood samples were tested. These samples came from the neonates' screening program in Liège Province (Belgium). These samples are all negative for CF.

An initial approach using the 99th percentile allow to determine a provisional cut-off at 4.06 µg/L.

The suggested normal range and cut-off are guidelines only. Each laboratory should establish specific thresholds and range based on performance of the assay in their laboratory and with their constituent demographic population.

N	Median (µg/L)	Percentile values			
		95th	97.5th	99th	99.5th
1,383	1.24	2.73	3.14	4.06	5.69

13. PERFORMANCES OF THE ASSAY

Performances are established following the automate procedure.

a. Detection limits

The limit of detection (LoD) for PAP is 0.559 µg/L, determined according to the guidelines in CLSI document EP17-A2 and with proportions of α and β error risks less than 5% based on 120 determinations, with 60 blanks and 60 low-level samples: LoB = 0.304 µg/L.

b. Precision

The Neonatal PAP Screening ELISA was evaluated for precision according to CLSI document EP05-A3.

It was achieved with internal controls, consisting of blood enriched with PAP at three different levels. The precision definition was based on 80 determinations (20 days, 2 runs per day, 2 replicates per run) performed with three lots of reagents.

Sample	Mean (µg/L)	Repeatability		Between-Run		Between-Day		Within-Laboratory	
		SD	CV	SD	CV	SD	CV	SD	CV
1	3.07	0.47	15.2	0.28	9.3	0.22	7.2	0.52	17.0
2	5.32	0.57	10.7	0.40	7.5	0.27	5.2	0.80	15.1
3	7.16	0.61	8.6	0.58	8.1	0.46	6.4	0.97	13.5

c. Interferences

The Neonatal PAP Screening ELISA was evaluated for interference according to CLSI document EP7-A2.

The following substances, when added to blood enriched with 1.5 µg/L of PAP, were found not to interfere at the concentration indicated. These include neonates' medication, sample additives, abnormal biochemical metabolites and one PAP structural analog.

A bias less than ± 0.2 µg/L is not considered as a significant interference.

Substance tested	Test concentration	Comments
Amoxicillin	95 mg/L	3x median serum concentration ⁹
Cefotaxime	306 mg/L	CLSI EP7-A2, Appendix C
Acyclovir	300 mg/L	3x median serum concentration ¹⁰
EDTA	1.3 mg/L	CLSI EP7-A2, Appendix C
Heparin	3,000 U/L	CLSI EP7-A2, Appendix C
Bilirubin	150 mg/L	CLSI EP7-A2, Appendix C
Vitamin K ₁	5 mg/L	3x neonates' plasma concentration ¹¹
Reg1A	1.3 µg/L	3x median serum concentration ¹²

The following substance, when added to blood enriched with 1.5 µg/L of PAP, was found to interfere above the indicated concentration.

Substance tested	Interfering concentration	Comments
Sodium citrate	8.08 g/L	Short draw*

*if the collection tube is correctly filled, the blood sodium citrate concentration is between 3 and 5.5 g/L (1:5 or 1:10 total volume).

14. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The Neonatal PAP Screening ELISA is a screening method for measuring the PAP concentration in newborn blood spot specimens. This assay is designed to be used with dried blood specimens that are collected on 903® and 2226 filter paper.
- Elevated results are not a diagnostic per se of cystic fibrosis but indicate the need for further study of the newborn from which a presumptive positive specimen was received.
- To ensure accurate and reliable results, make sure that all blood spot disks are within the extraction solution during the incubation period.
- Strict compliance to the protocol is advised to obtain reliable results. Any modification or change made to the kit or the assay procedure is under the responsibility of the user.
- Do not use cord blood.
- Sex, birth weight and gestational age can lead to small differences in PAP concentrations but do not significantly affect the screening protocol.⁸
- A specimen collected between 48 and 72 hours of age is optimal. There is an age-related increase in PAP levels and a specimen collection after 168 hours could lead to false-positive results.⁸
- Blood transfusion leads to clinically significant higher PAP levels and to a higher risk on a false-positive screening test result. It is probably due to the much higher levels of PAP found in adult blood.⁸
- Sick infants may have a false-positive screen due to increased stress on the body.⁸
- Premature infants or newborns with mild CF phenotype may exhibit false negative result due to limited pancreatic damage or immaturity of the pancreas.^{4,8}
- Newborns with meconium ileus may exhibit false negative result.³

ESPAÑOL

Inmunoensayo enzimático para la titulación de la Proteína Asociada a Pancreatitis en muestras de sangre seca de recién nacidos

E-LC-192 (192 determinaciones: 2x (12 tiras x 8 pocillos)

PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO (sólo para uso profesional)

1. USO PREVISTO

La Prueba ELISA de Detección de PAP Neonatal de Zentech es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de la proteína asociada a pancreatitis (PAP) en recién nacidos utilizando muestras de sangre seca en papel de filtro 903®. Este kit se utiliza como medio para identificar recién nacidos que tienen un mayor riesgo de padecer fibrosis quística (FQ).

2. APLICACIONES CLÍNICAS

La proteína asociada a pancreatitis (PAP), también denominada Reg3A, es una proteína secretora de 175 aminoácidos perteneciente a la familia de las lectinas de tipo C.^{1,2} No está presente en el páncreas sano, pero se sintetiza en grandes cantidades después de una situación de estrés pancreático continuado. Los estudios efectuados sobre la pancreatitis aguda han llevado a considerar el uso de la concentración de PAP en la sangre para la detección de la fibrosis quística.³

La fibrosis quística, el trastorno genético letal más común que afecta a la población caucásica (1/2.500 nacimientos), es una enfermedad multisistémica, caracterizada en la mayoría de los casos por una enfermedad pulmonar obstructiva crónica infantil, una insuficiencia pancreática exocrina y concentraciones anormales de electrolitos en el sudor. El diagnóstico de la FQ se basa en una combinación de los resultados clínicos anteriores y/o en un historial familiar positivo de la enfermedad junto con una prueba de sudor anormal.

Puesto que la PAP se sintetizó ya en el útero por el páncreas con FQ, los recién nacidos con FQ presentan un incremento de la concentración de PAP en la sangre en los primeros días de vida. Igual que sucede con la tripsina inmunorreactiva (TIR), el incremento de la PAP no es estrictamente específico de la FQ.^{5,6,7} Se demostró que todos los recién nacidos con FQ muestran un aumento tanto de la TIR como de la PAP, mientras que los que no tienen FQ muestran resultados normales o un aumento de la TIR o de la PAP, pero raramente de ambas.^{4,6,7} Por lo tanto, un ensayo de mancha de sangre seca para PAP tiene el potencial de detectar la FQ en los neonatos, además de un ensayo TIR.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La Prueba ELISA de Detección de PAP Neonatal es un inmunoensayo enzimático para cuantificar la proteína asociada a la pancreatitis (PAP) utilizando manchas de sangre secas.

La prueba ELISA de detección de PAP neonatal es una prueba ELISA de tipo "sándwich". Los pocillos están cubiertos con un anticuerpo anti-PAP que captura la PAP presente en la muestra. Después de una incubación y un paso de lavado para eliminar el material que no se ha ligado, se añade un anticuerpo anti-PAP biotinilado. Después de otra incubación y de un segundo paso de lavado, se añade un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) a los pocillos y se une a la biotina con alta afinidad. Después de una tercera incubación y de otro paso de lavado, el inmunocomplejo es detectado por la reducción de 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina (TMB) por el HRP. Esta reacción provoca la aparición de un color azul, cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de antígeno en el estándar o en la muestra. La reacción enzimática se detiene finalmente añadiendo ácido sulfúrico y se lee la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas de microtitulación ELISA.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL KIT

- Placa de microtitulación recubierta:** pocillos recubiertos con anticuerpos anti-PAP humana policlonales.
- Calibradores y controles, manchas de sangre:** bolsa de aluminio con los calibradores C0-C5 y los controles internos L1-L2 (manchas de sangre seca en papel de recogida de muestras 903@/226, utilizando una matriz humana que contiene una cantidad específica de PAP humana).
- Solución de extracción:** tampón listo para el uso con albúmina de suero bovino (BSA) y Tween® 20. Conservante: ProClin™ 300 0,05%.
- Anti-PAP biotinilado:** anticuerpo anti-PAP humano biotinilado liofilizado.
Rehidratar con 300 µL de agua destilada fresca y libre de gérmenes (**agitar min. 15 min. con vórtex o rodillo**). Diluir la solución concentrada 1:24 con el tampón de extracción, por ejemplo, 300 µL + 6900 µL = 7200 µL. Conservante: ProClin™ 300 0,015%.
Estabilidad después de la reconstitución: 12 días a 2-8°C.

El enjuague del tubo que contiene el anticuerpo con el tampón de extracción debe repetirse varias veces para recuperar todo el material.

Este paso es muy importante ya que un enjuague deficiente conducirá a resultados deficientes.

- Conjugado enzimático:** complejo estreptavidina-peroxidasa en una solución estabilizadora. Conservante: ProClin™ 300 0,05%. Listo para el uso. La conservación del conjugado a bajas temperaturas (2-8°C) puede provocar la formación de un precipitado blanco. Este precipitado se disuelve bajo agitación a temperatura ambiente.
- Solución de lavado:** Tampón de fosfato con detergente, concentrado x 10. Conservante: Timerosal 0,1%. Diluir la solución concentrada 1:10 con agua destilada o desionizada limpia y sin gérmenes, por ejemplo 55 ml + 495 ml = 550ml. La conservación de la solución de lavado concentrada a bajas temperaturas (2-8°C) puede provocar la formación de cristales. Estos cristales se disuelven mediante calentamiento (37°C) o dilución a la concentración de trabajo.
Estabilidad después de la dilución: 10 semanas a temperatura ambiente (20-25°C).
- Sustrato cromogénico:** TMB (3.3'-5.5' tetrametilbencidina). Listo para el uso.
- Reactivo de bloqueo:** H₂SO₄, 0,5M. Listo para el uso.

Reactivos	Cantidad 192 pruebas	Estado físico
Pocillos	2 x (12 x 8)	Lista para el uso
Calibradores 0-5 Controles 1-2	1 bolsa de aluminio	Manchas de sangre seca
Solución de extracción	1 x 55 mL	Lista para el uso
Anti-PAP biotinilado	4 juegos	Liofilizado
Conjugado enzimático	1 x 28 mL	Lista para el uso
Solución de lavado	3 x 55 mL	Concentrada 10x
Sustrato cromogénico	1 x 25 mL	Lista para el uso
Reactivo de bloqueo	1 x 28 mL	Lista para el uso

Se puede encargar solución cromogénica, reactivo de bloqueo y solución de lavado adicionales para el procesamiento automático utilizando la referencia:

E-LI-000: Reactivos adicionales para cribado neonatal

5. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DEL KIT

- Mantenga las manchas de sangre secas a -20°C en la bolsa original que contiene un desecante. Cuando se haya abierto la bolsa de aluminio, es necesario asegurarse de sellarla herméticamente de nuevo.
- Cuando no los utilice, almacene el kit y los otros reactivos en recipientes cerrados a una temperatura de 2-8°C, asegurándose sin embargo de que alcancen una temperatura de 20-25°C antes de utilizarlos.
- Los pocillos de microtitulación deben almacenarse a una temperatura de 2-8°C. Cuando se haya abierto la bolsa de aluminio, es necesario asegurarse de sellarla herméticamente de nuevo.
- Los reactivos sin abrir conservarán la reactividad hasta la fecha de expiración mostrada en la etiqueta. No utilice los reactivos una vez superada esa fecha.
- Una vez abiertos, los reactivos conservarán la reactividad durante dos meses si se almacenan a una temperatura de 2-8°C.

6. MATERIALES NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Pipetas automáticas monocanal o multicanal para dispensar volúmenes de entre 10 y 1.000 µL con una precisión de ± 1,5% en el rango de 10-100 µL.
- Sellador de microplacas
- Para el uso manual, un espectrofotómetro capaz de leer la absorbancia a 450 nm y 630 nm.
- Un perforador que produzca discos de 3,0 mm o 3,2 mm (1/8").
- Un agitador de microplacas (900 rpm o 15 Hz - 300 rpm o 5Hz).

$$rpm = \sqrt{\frac{RCF}{r \times 1.118}} \times 10^3$$

Donde **r** es el radio orbital en mm (comprueba las especificaciones de tu aparato y, si es necesario, divide el diámetro por dos).

RCF = 0,35g

Tarjetas de recogida de sangre. La información mínima necesaria impresa de antemano es la siguiente:

- nombre del recién nacido;
- nombre de la madre;
- número de identificación del paciente;
- fecha de nacimiento;
- sexo;
- fecha de toma de la muestra;
- identificación y dirección de quién la envía;
- nombre y número de teléfono del médico;
- fabricante y número de lote del papel filtro.

El papel filtro solo debe ser 903@ o 226

7. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Solo para diagnóstico *in vitro*.

Con el fin de evitar la contaminación personal y ambiental, es necesario observar las siguientes precauciones:

- Utilice guantes desechables mientras manipule material potencialmente infeccioso y durante la realización de la prueba.
- No pipetee los reactivos con la boca.
- No fume, coma, beba o aplique cosméticos durante la prueba.
- Todo el material de origen humano utilizado para la preparación de este kit ha dado negativo en las pruebas de HBsAg, VIH y HCV. Dado que en la actualidad ninguna prueba puede garantizar la ausencia total de estos virus, todas las muestras y reactivos utilizados para la prueba deben considerarse potencialmente infecciosos; por lo tanto, los residuos de la prueba deben descontaminarse y eliminarse de acuerdo con los procedimientos de seguridad establecidos. El material inflamable desechable debe ser incinerado; el material desechable no inflamable debe ser esterilizado en autoclave durante al menos 1 hora a 121°C.

Los residuos líquidos deben mezclarse con hipoclorito de sodio a una concentración final del 3%. Deje que el hipoclorito actúe durante al menos 30 minutos. Los residuos líquidos que contengan ácido deben neutralizarse con cantidades adecuadas de base antes de tratarlos con hipoclorito de sodio.

- Es necesario evitar las salpicaduras y la formación de aerosoles; en caso de derrame, lavarlo cuidadosamente con una solución de hipoclorito de sodio al 3% y eliminar ese líquido como residuo potencialmente infeccioso.
- Las soluciones de sustrato cromogénico y reactivo de bloqueo deben manipularse con cuidado. Debe evitarse el contacto con la piel, los ojos y las mucosas. En caso de accidente, enjuagar bien con agua corriente.
- La solución de lavado contiene timerosal.
- La solución de extracción, el anticuerpo anti-PAP biotinilado y el conjugado enzimático contienen ProClin™ 300 (H315/H317/H318/H410). Este producto es altamente tóxico por inhalación, ingestión y contacto con la piel. Manténgase alejado de alimentos y bebidas.
- El reactivo de bloqueo contiene ácido sulfúrico (4,9% p/p) (H331/H314/H315)
- Utilizar ropa y guantes de protección. En caso de contacto con la piel o los ojos, enjuagar con abundante agua. En caso de accidente, consultar inmediatamente con un médico, mostrándole la etiqueta del producto.

Frases de riesgo:

- H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
- H315 Provoca irritación cutánea
- H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel
- H318 Provoca lesiones oculares graves
- H331 Tóxico en caso de inhalación
- H410 Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos

Para obtener resultados reproducibles, deben observarse las siguientes reglas:

- **Es mejor utilizar una pipeta automática multicanal para garantizar buenos resultados**
- **Evitar cualquier contacto entre la punta y el lateral de los pocillos. Evitar cualquier degradación de la fase activa.**
- No mezcle reactivos de diferentes números de lote o de otros fabricantes.
- No congele los kits.
- Para obtener resultados precisos, se recomienda cumplir estrictamente el tiempo y la temperatura específicos de las incubaciones.
- Deje que las tiras de micropocillos y los reactivos se equilibren a temperatura ambiente antes de abrirlos y utilizarlos.
- No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad.
- El lavado incompleto o ineficiente provocará una precisión insatisfactoria y un fondo elevado.
- Utilice utensilios de cristal completamente limpios, libres de contaminación de iones metálicos o sustancias oxidantes.
- Utilice agua destilada, almacenada en recipientes limpios.
- No deben utilizarse sueros contaminados con microbios ni muestras que contengan partículas pesadas y visibles.
- La contaminación cruzada de reactivos o muestras puede causar resultados falsos. Utilice una punta de pipeta nueva, limpia y desechable, para cada reactivo o manipulación de la muestra.
- No exponga el sustrato cromogénico a la luz durante el almacenamiento o la incubación.
- Siga los tiempos exactos de incubación. Dispense las soluciones de reactivo de bloqueo y sustrato cromogénico en no más de 3-4 minutos; dispense los dos reactivos en la misma secuencia.
- Los restos de hipoclorito de sodio pueden destruir la actividad biológica de muchos reactivos.

Hay diversos factores que influyen en el rendimiento del ensayo. Entre ellos se incluyen la precisión y reproducibilidad de la técnica de pipeteado, el fotómetro utilizado o el sesgo de tiempo durante el ensayo.

8. RECOGIDA DE MUESTRAS

La toma de la muestra de sangre debe efectuarse preferiblemente entre el segundo y el tercer día de vida del recién nacido (48 a 72 horas después del nacimiento), ya que se produce un incremento de los niveles de PAP relacionado con la edad. La toma de la muestra después de 168 horas podría dar lugar a resultados falsos positivos.⁸

Tome la sangre del talón del recién nacido utilizando solo la porción medial (más próxima a la línea central del cuerpo) o lateral (más alejada de la línea central del cuerpo) de la superficie plantar (para caminar). La toma de sangre de otras zonas del pie del recién nacido, como por ejemplo el arco, puede provocar daños en nervios, tendones o cartílagos.

Rellene la información requerida en el formulario o tarjeta de recogida de sangre (vea la sección 6).

Para aumentar el flujo sanguíneo local, caliente el sitio de punción de la piel con una toalla húmeda tibia (<42°C) aplicada en el sitio durante 2 a 3 minutos. Si se mantiene la extremidad del recién nacido por debajo del nivel del corazón, ello hará que aumente el flujo venoso.

Limpie la piel con alcohol isopropílico al 70% (v/v). Pase una gasa estéril y deje que la piel se seque al aire.

Pinche el talón con una lanceta estéril (2,4-2,5 mm de longitud) o con un aparato para lancetas automático. Limpie la primera gota de sangre con una gasa estéril.

Toque suavemente un lado del papel de filtro contra una gota grande de sangre y, en solo un paso, deje que una cantidad suficiente de sangre se absorba en el papel para llenar completamente el círculo preimpreso. Asegúrese de que la sangre haya penetrado y saturado el papel examinando las dos caras del mismo. Repita el procedimiento para llenar el número necesario de círculos preimpresos en la tarjeta de recogida de muestras.

No apriete o exprima el sitio de punción durante la recogida, ya que ello podría causar hemólisis o la dilución de la sangre con líquidos tisulares.

No aplique gotas de sangre sucesivas en el mismo círculo preimpreso. Si el flujo de sangre disminuye antes de llenar por completo el círculo preimpreso, repita la toma de muestra en un nuevo círculo.

No toque ni extienda las manchas de sangre.

La sangre del cordón umbilical no debe utilizarse como muestra.

A continuación se deja secar la muestra al aire durante 4 horas a temperatura ambiente y se almacena en sobres o contenedores de papel sellados que la protejan contra la humedad, la luz, el calor y el contacto con otros materiales.

Organice el transporte de la tarjeta de toma de muestra al laboratorio de análisis durante las 24 horas posteriores a la recogida.

El laboratorio receptor debe almacenar las muestras a 2-8°C para su almacenamiento a corto plazo en un entorno a prueba de humedad y protegido de la luz directa. Para el almacenamiento a largo plazo, las muestras deben almacenarse a una temperatura de -20°C en un ambiente a prueba de humedad.

Los discos de muestra deben perforarse de zonas similares en cada mancha de sangre individual. No perforar discos de muestra de zonas que incluyan marcas impresas o que estén cerca de los bordes de la mancha de sangre.

9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

La fiabilidad de los resultados depende del cumplimiento estricto del procedimiento descrito.

Distribución sugerida de la placa de ensayo (solo se incluye a modo de guía).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C0	C0	Smp									
B	C1	C1										
C	C2	C2										
D	C3	C3										
E	C4	C4										
F	C5	C5										
G	L1	L1										
H	L2	L2										

Procedimiento manual:

Preparación de la muestra

1. Deje que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente antes de utilizarlos. Mezcle suavemente los reactivos durante al menos 15 minutos para homogeneizarlos.
2. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación y colóquelas en el soporte de tiras, teniendo en cuenta el número de calibradores C0-C5, controles L1-L2 y muestras que serán examinadas. Se recomienda analizar los calibradores y controles por duplicado.
3. Siguiendo la distribución sugerida de la placa, perforo manchas de sangre de 3.0 mm o 1/8" de diámetro de los calibradores (C0 a C5) y controles (L1 y L2) en sus respectivos pocillos. Perfore las muestras de los pacientes en los pocillos individuales restantes, anotando la posición de cada muestra de paciente en la placa. Las manchas deben ser perforadas en el centro de los discos.
No esterilice los calibradores, los controles internos ni las muestras de los pacientes en autoclave antes de hacer la perforación.

Extracción de PAP

4. Añada 100 µL de solución de extracción a cada pocillo.

Cada pocillo debe examinarse visualmente para asegurarse de que las manchas de sangre están completamente sumergidas en la solución.

Cubra los pocillos con una cinta selladora para evitar la evaporación.

5. Incubar la placa durante 1h15 a 37°C en un agitador de placas microtiter a 900 rpm. (véase la sección 6) Asegúrese, mediante una inspección visual periódica, de que cada disco está completamente sumergido en la solución de extracción.
6. Durante esta incubación, prepare las soluciones de anticuerpo anti-PAP biotinilado y de lavado de trabajo (vea sección 4).

7. Después de la incubación, vacíe completamente todos los pocillos invirtiendo la placa. Asegúrese de que todas las manchas de sangre sean eliminadas.

Hay un vídeo de una eliminación adecuada de muestras biológicas:

https://youtu.be/ozS_ADEVnJE



8. Lave cada pocillo 3 veces con 350 µL de solución de lavado diluida. **Para obtener buenos resultados se requiere una tasa de lavado suave (se recomienda una tasa de dispensación de 100 µL/s).**

Después de cada paso de lavado, asegúrese de que todos los pocillos estén vacíos (líquido restante < 15 µL). Después del último lavado, retire cuidadosamente todo el líquido restante golpeando las tiras sobre papel absorbente antes del paso siguiente. **Asegúrese de configurar la lavadora. Tenga en cuenta que un lavado incompleto o ineficiente dará lugar a una precisión insatisfactoria y un fondo elevado.**

Formación del complejo inmune

9. Añada a cada pocillo 100 µL de la solución de anticuerpo anti-PAP biotinilada diluida.
10. Cubra los pocillos con cinta selladora.
11. Incube durante 2 horas a 37°C en un agitador de placas de microtitulación (la velocidad recomendada es de 300 rpm).
12. Después de la incubación, repita el lavado tal como se ha descrito anteriormente.

Reacción de amplificación

13. Añada 100 µL del conjugado enzimático listo para el uso a cada pocillo.
14. Cubra los pocillos con cinta selladora.
15. Incube durante 20 minutos a temperatura ambiente (15-30°C) en un agitador de placas de microtitulación (la velocidad recomendada es de 300 rpm).
16. Después de la incubación, repita el lavado tal como se ha descrito anteriormente.

Generación de color

17. Dispense 100 µL del sustrato cromogénico en cada pocillo.
18. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (15-30°C) manteniendo la placa alejada de la luz y sin agitar.
19. Después de la incubación, detenga la reacción enzimática añadiendo 100 µL del reactivo de bloqueo a cada pocillo.

Lectura de la placa

20. Mida la absorbancia a 450 nm. Se recomienda la lectura de longitud de onda dual utilizando 630 nm como referencia, pero no es obligatorio.

La absorbancia debe leerse durante los 20 minutos posteriores a la finalización del ensayo.

Reactivos	Pocillos	Calibrador (C0-C5)	Control (L1-L2)	Muestras
Calibradores		1 x 3,0 mm	----	----
Controles		----	1 x 3,0 mm	----
Muestras		----	----	1 x 3,0 mm
Solución de extracción		100 µL	100 µL	100 µL
- Cubra la placa y eluya durante 1 hora y 15 minutos a 900 rpm y 37°C - Aspire y lave 3 x 350 µL				
Anti-PAP biotinilado		100 µL	100 µL	100 µL
- Cubra la placa e incube durante 2 horas a 300 rpm y 37°C - Aspire y lave 3 x 350 µL				
Conjugado enzimático		100 µL	100 µL	100 µL
- Cubra la placa e incube durante 20 minutos a 300 rpm y temperatura ambiente - Aspire y lave 3 x 350 µL				
Sustrato cromogénico		100 µL	100 µL	100 µL
- Cubra la placa e incube durante 15 minutos a temperatura ambiente lejos de la luz				
Reactivo de bloqueo		100 µL	100 µL	100 µL
- Lea: 450 nm y 630 nm como referencia				

Procedimiento automático: 4 horas y 30 minutos

Prepare las muestras siguiendo las instrucciones indicadas en el procedimiento manual (vea la sección Preparación de la muestra). Prepare las soluciones de lavado de trabajo y anticuerpo anti-PAP biotinilado (vea la sección 4).

El procedimiento automatizado sigue el protocolo proporcionado junto con la máquina.

No olvide que habrá que retirar los punzones de la placa de microtitulación después de la primera incubación.

Se puede encargar sustrato cromogénico, reactivo de bloqueo y solución de lavado adicionales para el procesamiento automático utilizando la referencia:

E-LI-000: Newborn Screening Extra Reagents

10. CÁLCULO DE RESULTADOS

Curva de titulación

COMPRUEBE EN EL FOLLETO DE LA CAJA DE CADA LOTE LOS VALORES EXACTOS DE LOS CALIBRADORES Y CONTROLES.

La cantidad de PAP en la muestra del paciente se calcula a partir de una curva estándar preparada a partir de una cantidad conocida de PAP humana calibrada mediante un método interno propio. Actualmente no existe ningún material de referencia estandarizado para la PAP.

La curva estándar puede cambiar entre lotes distintos. Es necesario consultar la etiqueta en el lote de calibradores que esté utilizando para saber qué valores de calibración utilizar en los cálculos.

Los valores de la concentración de PAP se expresan en µg/L.

Utilice una curva de regresión cuadrática para calcular los resultados después de promediar los duplicados de absorbancia (si procede).

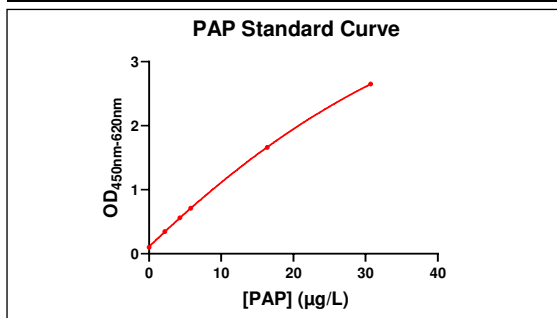
- Eje X: utilizar la concentración de manera lineal
- Eje Y: utilizar la densidad óptica de manera lineal

A continuación, se muestran los resultados de un ensayo típico. **Esta curva solo tiene carácter ilustrativo y no debe utilizarse para calcular resultados de pacientes.**

La concentración máxima que puede indicarse está limitada por las características de rendimiento lineal del fotómetro utilizado.

Si el valor de la densidad óptica (DO) del calibrador más alto se sitúa por encima del rango del fotómetro, este calibrador debe ser omitido del trazado de la curva del calibrador. Del mismo modo, toda muestra que tenga valores por encima del rango del lector de microplacas debe ser simplemente anotada como mayor que el calibrador más alto aceptable o debe ser diluida.

Calibrador	[PAP] µg/L	DO 450nm
Cal 0	0	0,101
Cal 1	2,2	0,346
Cal 2	4,3	0,559
Cal 3	5,8	0,712
Cal 4	16,4	1,662
Cal 5	30,7	2,649



11. CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos (L1-L2) incluidos en el kit deben ser supervisados rutinariamente con el fin de comprobar si las concentraciones medidas se mantienen dentro de los valores establecidos. Estos controles proporcionan información valiosa con respecto a la validez de la prueba de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

12. RANGO NORMAL SUGERIDO

Con el fin de calcular el rango normal y los valores límite, se analizaron 1.383 muestras de sangre seca. Estas muestras procedían del cribado de recién nacidos efectuado en la provincia de Lieja (Bélgica). Estas muestras eran todas negativas por la FQ.

Un enfoque inicial utilizando el percentil 99 permite determinar un límite provisional de 4,06 µg/L.

El rango normal sugerido y el límite solo son orientativos. Cada laboratorio debe establecer sus propios umbrales y rangos específicos basados en el rendimiento del ensayo en su laboratorio y con las características demográficas de su población.

N	Mediana (µg/L)	Valores de percentil			
		95	97,5	99	99,5
1.383	1,24	2,73	3,14	4,06	5,69

13. RESULTADOS DEL ENSAYO

Los resultados se establecen siguiendo el procedimiento automatizado

a. Límites de detección

El límite de detección (LoD) para la PAP es de 0,559 µg/L, determinado con arreglo a las directrices del documento EP17-A2 del CLSI y con proporciones de riesgos de error α y β inferiores al 5% sobre la base de 120 determinaciones, con 60 muestras en blanco y 60 muestras de nivel bajo; LoB = 0,304 µg/L.

b. Precisión

La precisión de la Prueba ELISA de Detección de PAP Neonatal se evaluó con arreglo a lo establecido en el documento EP05-A3 del CLSI.

Ello se hizo mediante controles internos, consistentes en sangre enriquecida con PAP en tres niveles diferentes. La definición de precisión se basó en 80 determinaciones (20 días, 2 series al día, 2 réplicas por serie) realizadas con tres lotes de reactivos.

Mue.	Med. (µg/L)	Repetibilidad		Entre distintas series		Entre días		Intra-laboratorio	
		SD	CV	SD	CV	SD	CV	SD	CV
1	3,07	0,47	15,2	0,28	9,3	0,22	7,2	0,52	17,0
2	5,32	0,57	10,7	0,40	7,5	0,27	5,2	0,80	15,1
3	7,16	0,61	8,6	0,58	8,1	0,46	6,4	0,97	13,5

Mue. = Muestra

Med. = Mediana

c. Interferencias

La interferencia de la Prueba ELISA de Detección de PAP Neonatal se evaluó con arreglo a lo establecido en el documento EP7-A2 del CLSI.

Las siguientes sustancias, cuando se añaden a sangre enriquecida con 1,5 µg/L de PAP, no interfieren a la concentración indicada. Entre estas sustancias se incluyen fármacos para recién nacidos, aditivos para muestras, metabolitos bioquímicos anómalos y un análogo estructural de la PAP.

Un sesgo inferior a $\pm 0,2$ µg/L no se considera una interferencia significativa.

Sustancia examinada	Concentración de ensayo	Comentarios
Amoxicilina	95 mg/L	3x concentración sérica mediana ⁹
Cefotaxima	306 mg/L	CLSI EP7-A2, Apéndice C
Aciclovir	300 mg/L	3x concentración sérica mediana ¹⁰
EDTA	1,3 mg/L	CLSI EP7-A2, Apéndice C
Heparina	3.000 U/L	CLSI EP7-A2, Apéndice C
Bilirrubina	150 mg/L	CLSI EP7-A2, Apéndice C
Vitamina K ₁	5 mg/L	3x concentración plasmática de los recién nacidos ¹¹
Reg1A	1,3 µg/L	3x concentración sérica mediana ¹²

Se estableció que la siguiente sustancia, cuando se añade a sangre enriquecida con 1,5 µg/L de PAP, no interfiere a la concentración indicada.

Sustancia examinada	Concentración interferente	Comentarios
Citrato de sodio	8,08 g/L	"Extracción corta"

*si el tubo de recogida se llena correctamente, la concentración de citrato de sodio en sangre es de entre 3 y 5,5 g/L (1:5 o 1:10 volumen total).

14. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La Prueba ELISA de Detección de PAP Neonatal es un método de detección para medir la concentración de PAP en las muestras de manchas de sangre de recién nacidos. Este ensayo está diseñado para ser utilizado con muestras de sangre seca que se recogen exclusivamente en papel de filtro 903®.
- Los resultados elevados no constituyen por sí mismos un diagnóstico de fibrosis quística, pero indican la necesidad de realizar estudios adicionales del recién nacido del que se haya recibido una muestra presuntamente positiva.
- Con el fin de garantizar la obtención de resultados precisos y fiables, es necesario asegurarse de que todos los discos de manchas de sangre estén dentro de la solución de extracción durante el periodo de incubación.
- Se aconseja el cumplimiento estricto del protocolo para obtener resultados fiables. Las modificaciones o cambios realizados en el kit o en el procedimiento del ensayo son responsabilidad del usuario.
- No utilice sangre de cordón umbilical.
- El sexo, el peso al nacer y la edad gestacional pueden dar lugar a pequeñas diferencias en las concentraciones de PAP, pero no afectan significativamente el protocolo de detección.⁸
- Las muestras recogidas entre las 48 y 72 horas de edad son muestras óptimas. Puesto que se produce un aumento de los niveles de PAP relacionado con la edad, la toma de la muestra después de 168 horas podría dar lugar a resultados falsos positivos.⁸
- La transfusión de sangre provoca niveles de PAP más altos significativos desde el punto de vista clínico y produce un mayor riesgo de resultado falso positivo en la prueba de detección. Es probable que este incremento se deba a los niveles de PAP mucho más altos se encuentran en la sangre de los adultos.⁸
- Los recién nacidos enfermos pueden tener un resultado de detección falso positivo debido al aumento del estrés en el cuerpo.⁸
- Los bebés prematuros o los recién nacidos con fenotipo de fibrosis quística leve pueden presentar resultados falsos negativos debido al daño pancreático limitado o a la inmadurez del páncreas.^{4,8}
- Los recién nacidos con íleo meconial pueden mostrar resultados falsos negativos.³

FRANCAIS

Test immunoenzymatique pour le dosage de la protéine associée à la pancréatite à partir de gouttes de sang séché de nouveau-nés

E-LC-192 (192 déterminations : 2x (12 barrettes x 8 puits))

POUR DU DIAGNOSTIC IN VITRO (à usage professionnel uniquement)

1. UTILISATION PRÉVUE

Le Neonatal PAP Screening ELISA de ZenTech est un test immunoenzymatique pour le dosage quantitatif de la protéine associée à la pancréatite (PAP) chez les nouveau-nés. Il est réalisé à l'aide d'échantillons de sang séché sur du papier filtre 903®. Ce kit est utilisé pour aider à identifier les nouveau-nés qui présentent un risque accru de mucoviscidose (CF).

2. APPLICATIONS CLINIQUES

La protéine associée à la pancréatite (PAP), également connue sous le nom de Reg3A, est une protéine pancréatique de 175 acides aminés qui fait partie de la famille des « C-type lectins ». ^{1,2} Elle est absente du pancréas sain mais est synthétisée en grande quantité après un stress pancréatique soutenu. Des études sur la pancréatite aiguë ont conduit à envisager l'utilisation de la concentration sanguine de PAP pour le dépistage de la mucoviscidose. ³

La mucoviscidose (CF) est la maladie génétique mortelle la plus courante de la population caucasienne (1/2.500 naissances), c'est une maladie multi-systémique, le plus souvent caractérisée par une maladie pulmonaire obstructive chronique dès l'enfance, une insuffisance exocrine pancréatique et des concentrations anormales d'électrolytes dans la sueur. Le diagnostic de la CF est basé sur une combinaison des résultats cliniques ci-dessus et/ou sur des antécédents familiaux positifs de la maladie, en conjonction avec un test de sueur anormal.

Comme la PAP est déjà synthétisée *in utero* dans le pancréas des personnes atteintes de CF, les nouveau-nés atteints de CF ont une concentration sanguine de PAP élevée dès les premiers jours de vie. Comme pour le trypsino-gène immunoréactif (IRT), l'élévation de la PAP n'est pas strictement spécifique à la CF. ^{5,6,7} Il a été démontré que tous les nouveau-nés atteints de CF présentent une élévation à la fois de l'IRT et de la PAP, alors que ceux qui ne sont pas atteints de CF présentent soit des résultats normaux, soit une élévation de l'IRT ou de la PAP, mais rarement les deux. ^{4,6,7} Par conséquent, un dosage de la PAP à partir de gouttes de sang séché a du potentiel pour dépister des nouveau-nés atteints de CF, en plus du test IRT.

3. PRINCIPE DU TEST

Le test Neonatal PAP Screening ELISA est un test immuno-enzymatique permettant de quantifier la protéine associée à la pancréatite (PAP) à l'aide de gouttes de sang séché.

Le Neonatal PAP Screening ELISA un test ELISA en sandwich. Les puits de la microplaque sont recouverts d'un anticorps anti-PAP qui capture la PAP présente dans l'échantillon. Après une incubation et une étape de lavage pour éliminer le matériel non lié, un anticorps anti-PAP biotinylé est ajouté. Après une autre incubation et une deuxième étape de lavage, un conjugué streptavidine-peroxydase de raifort (HRP) est ajouté dans les puits et se lie à la biotine avec une grande affinité. Après une troisième incubation et une autre étape de lavage, l'immuno-complexe est détecté par la réduction de la 3,3'-5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) par la HRP. Cette réaction conduit au développement d'une coloration bleue, qui est directement proportionnelle à la quantité d'antigène dans le calibrateur, le contrôle ou l'échantillon. La réaction enzymatique est finalement arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique. L'absorbance à 450 nm est lue à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque.

4. RÉACTIFS FOURNIS AVEC LE KIT

- 1. Microplaques** recouvertes d'anticorps polyclonaux anti-PAP humaine.
- 2. Calibrateurs et contrôles sous forme de goutte de sang séché :** pochette en aluminium avec calibrateurs C0-C5 et contrôles internes L1-L2 (gouttes de sang séché sur du papier de prélèvement 903® ou 226 contenant une quantité déterminée de PAP humaine).
- 3. Solution d'extraction :** tampon prêt à l'emploi avec de la BSA et du Tween® 20. Conservateur : ProClin™ 300 0,05%.
- 4. Anti-PAP biotinylé :** anticorps anti-PAP biotinylé évaporé. Réhydrater avec 300 µL d'eau distillée fraîche et exempte de germes. (agiter pendant 15 min. avec vortex ou sur roulement) Diluer ensuite cette solution concentrée 24 fois avec le tampon d'extraction : 300 µL + 6900 µL de tampon d'extraction = 7200 µL, par exemple. Conservateur : ProClin™ 300 0,015%. Stabilité après reconstitution : 12 jours à 2-8°C.

Le tube contenant l'anticorps reconstitué avec de l'eau doit être rincé plusieurs fois avec le tampon d'extraction afin de récupérer tout le matériel. Cette étape est très importante car un mauvais rinçage entraînera de mauvais résultats.

- 5. Conjugué enzymatique :** Solution prête à l'emploi contenant le complexe streptavidine-peroxydase. Conservateur : ProClin™ 300 0,05%. La conservation de ce réactif à basse température (2-8°C) peut entraîner la formation d'un précipité blanc. Ce précipité se dissout sous agitation à température ambiante.
- 6. Solution de lavage :** Solution à base de détergents et de sels de phosphate, concentrée 10x. Conservateur : Thimérosal 0,1 %. Diluer la solution concentrée 10 fois avec de l'eau fraîche distillée ou déionisée et exempte de germes, par exemple 55 mL + 495 mL d'eau = 550 mL. La conservation de la solution de lavage concentrée à basse température (2-8°C) peut entraîner la formation de cristaux. Ces cristaux se dissolvent en chauffant (37°C) ou en la diluant. Stabilité après dilution : 10 semaines à température ambiante.
- 7. Substrat chromogène :** TMB (3,3'-5,5' tétraméthylbenzidine). Prêt à l'emploi.
- 8. Solution d'arrêt :** H₂SO₄, 0,5M. Prêt à l'emploi.

Réactifs	Quantité 192 tests	État physique
Microplaque	2 x (12 x 8)	Prêt à l'emploi
Calibrateurs 0-5 Contrôles 1-2	1 pochette en aluminium	Gouttes de sang séché
Solution d'extraction	1 x 55 mL	Prêt à l'emploi
Anti-PAP biotinylé	4 fioles	Lyophilisé
Conjugué enzymatique	1 x 28 mL	Prêt à l'emploi
Solution de lavage	3 x 55 mL	10x concentré
Substrat chromogène	1 x 25 mL	Prêt à l'emploi
Solution d'arrêt	1 x 28 mL	Prêt à l'emploi

Une solution chromogène, une solution d'arrêt et une solution de lavage supplémentaires peuvent être commandées par une procédure automatisée en utilisant la référence : E-LI-000 : Réactifs supplémentaires pour le dépistage des nouveau-nés.

5. STOCKAGE ET STABILITÉ DU KIT

- Conservé les calibrateurs et les contrôles à -20°C dans le sachet d'origine contenant un dessiccant. Veiller à la fermer hermétiquement.
- Conservé le kit et les autres réactifs à 2-8°C dans la boîte fermée lorsqu'ils ne sont pas utilisés. S'assurer que tous les réactifs soient revenus à température ambiante avant leur utilisation.

- Les microplaques doivent être conservées entre 2-8°C. Une fois la pochette en aluminium ouverte, veiller à la refermer hermétiquement.
- Les réactifs non ouverts conserveront leur réactivité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser de réactifs au-delà de cette date.
- Lorsqu'ils sont ouverts et stockés entre 2-8°C, les réactifs conservent leur réactivité pendant deux mois.

6. MATÉRIAUX REQUIS MAIS NON FOURNIS

- Pipettes automatiques à un ou plusieurs canaux pour délivrer des volumes de 10 à 1000 µL avec une précision de ± 1,5% sur la plage 10-100 µL.
- Film adhésif pour microplaques
- Pour une utilisation manuelle, un spectrophotomètre capable de lire l'absorbance à 450 nm et à 630 nm.
- Un perforateur qui produit des disques de 3,0 mm ou 3,2 mm (1/8")
- Un agitateur de microplaques (900 tr/min ou 15 Hz – 300 tr/min ou 5 Hz).

$$\text{rpm} = \sqrt{\frac{\text{RCF}}{r \times 1.118}} \times 10^3$$

Où r est le rayon orbital en mm (vérifiez les spécifications de votre appareil et, si nécessaire, divisez le diamètre par deux).

RCF : 0,35g

- Cartes de prélèvement sanguin. Les informations préimprimées minimales requises sont les suivantes
 - nom de l'enfant
 - nom de la mère
 - numéro d'identification du patient
 - la date de naissance
 - sexe
 - la date de prélèvement de l'échantillon
 - l'identité et l'adresse du demandeur
 - le nom et le numéro de téléphone du médecin
 - le fabricant et le numéro de lot du papier filtre.
- Le papier filtre doit être du 903® ou 226

7. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour le diagnostic *in vitro* uniquement.

Afin d'éviter la contamination des personnes et de l'environnement, les précautions suivantes doivent être observées :

- Utiliser des gants jetables lors de la manipulation de matériel potentiellement infectieux et de la réalisation du test.
- Ne pas pipeter les réactifs avec la bouche.
- Ne pas fumer, manger, boire ou appliquer des produits cosmétiques pendant le test.
- Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation de ce kit est testé négatif pour l'HBsAg, l'anti-VIH et l'anti-VHC. Comme aucun test ne peut actuellement garantir l'absence totale de ces virus, tous les échantillons et réactifs utilisés pour le test doivent être considérés comme potentiellement infectieux ; les déchets du test doivent donc être décontaminés et éliminés, conformément aux procédures de sécurité établies. Le matériel inflammable jetable doit être incinéré ; le matériel non inflammable jetable doit être stérilisé en autoclave pendant au moins 1 heure à 121°C. Les déchets liquides doivent être traités avec de l'hypochlorite de sodium à une concentration finale de 3 %. Laisser agir l'hypochlorite pendant au moins 30 minutes. Les déchets liquides contenant de l'acide doivent être neutralisés avec des quantités appropriées de base avant d'être traités à l'hypochlorite de sodium.
- Éviter les éclaboussures et la formation d'aérosols ; en cas de déversement, laver soigneusement avec une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % et éliminer ce liquide de nettoyage comme un déchet potentiellement infectieux.
- Le substrat chromogène et la solution d'arrêt doivent être manipulés avec précaution. Évitez tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas d'accident, rincer abondamment à l'eau courante.
- La solution de lavage contient du thimérosal.

- La solution d'extraction, l'anti-PAP biotinylé et le conjugué enzymatique contiennent du ProClin™ 300 (H315/H317/H318 /H410). Ce produit est très toxique par inhalation, ingestion et contact avec la peau. Conserver à l'écart des aliments et des boissons.
- La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique (4,9% p/p) (H331/H314/H315)
- Porter des vêtements et des gants de protection. En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau. En cas d'accident, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'étiquette du produit.

Phrases de risque :

- H314 provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires
- H315 provoque des irritations cutanées
- H317 peut provoquer une réaction allergique cutanée
- H318 provoque de graves lésions oculaires
- H331 toxique si inhalé
- H410 très toxique pour la vie aquatique avec des effets durables

Afin d'obtenir des résultats reproductibles, les règles suivantes doivent être respectées :

- **Il est préférable d'utiliser une pipette automatique multicanaux pour garantir de bons résultats**
- **Éviter tout contact entre l'embout et la paroi des puits. Pour éviter toute dégradation de la phase active.**
- Ne pas mélanger des réactifs provenant de numéros de lot différents ou d'autres fabricants.
- Ne pas congeler les kits.
- Il est recommandé de respecter strictement les durée et température spécifiques des incubations pour obtenir des résultats précis.
- Laisser les microplaques et les réactifs revenir à température ambiante avant de les ouvrir et de les utiliser.
- Ne pas utiliser les réactifs après leur date d'expiration.
- Un lavage incomplet et inefficace entraînera une mauvaise précision et un bruit de fond élevé.
- Utiliser de la verrerie parfaitement propre, exempte de toute contamination par des ions métalliques ou des substances oxydantes.
- Utiliser de l'eau distillée, stockée dans des récipients propres.
- Des échantillons présentant des particules lourdes et visibles ne doivent pas être utilisés.
- Les contaminations croisées de réactifs ou d'échantillons pourraient entraîner des résultats erronés. Utiliser un embout de pipette propre et jetable pour chaque manipulation de réactifs ou d'échantillons.
- Ne pas exposer le substrat chromogène à la lumière pendant le stockage ou l'incubation.
- Respecter les temps d'incubation mentionnés dans ce protocole. Dispenser les solutions de substrat chromogène et de solution d'arrêt en 3-4 minutes au maximum ; dispenser ces deux réactifs dans le même ordre.
- Les traces d'hypochlorite de sodium peuvent détruire l'activité biologique de nombreux réactifs.

Divers facteurs peuvent influencer les performances des tests. Il s'agit notamment de la précision et de la reproductibilité du pipetage, du spectrophotomètre utilisé ou du biais temporel pendant l'essai.

8. COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

Idéalement, le sang devrait être prélevé entre le deuxième et le troisième jour de vie (48 à 72 heures après la naissance) car les niveaux de PAP augmentent avec l'âge. Un prélèvement effectué après 168 heures pourrait conduire à des résultats faussement positifs.⁸

Ne prélever le sang du talon du nourrisson qu'en utilisant la partie médiane (la plus proche de la ligne centrale du corps) ou latérale (la plus éloignée de la ligne centrale du corps) de la surface plantaire (de marche). Le prélèvement de sang dans une autre zone du pied du nourrisson, telle que la voûte plantaire, peut entraîner une lésion des nerfs, des tendons ou des cartilages.

Remplissez les informations requises sur le formulaire ou la carte de prélèvement sanguin (voir section 6).

Pour augmenter le flux sanguin local, réchauffer le site de ponction cutanée à l'aide d'une serviette chaude et humide (<42°C) appliquée sur la zone pendant 2 à 3 minutes. De même, le fait de maintenir le membre du nourrisson sous le niveau du cœur augmentera le flux veineux.

Nettoyer la peau avec de l'alcool isopropylique à 70 % (v/v). Essuyer avec une gaze stérile et laissez la peau sécher à l'air libre.

Piquer le talon avec une lancette stérile (2,4-2,5 mm de long) ou avec un dispositif de type lancette automatique. Essuyer la première goutte de sang avec une gaze stérile.

Déposer doucement une grosse goutte de sang sur le papier de prélèvement, laisser une quantité suffisante de sang s'imprégner dans le papier pour remplir complètement le cercle préimprimé (en une seule étape). S'assurer que le sang a pénétré et saturé le papier en examinant les deux faces du papier. Répéter la procédure pour remplir le nombre requis de cercles préimprimés sur la carte de prélèvement d'échantillons.

Ne pas presser le talon pendant le prélèvement car cela peut provoquer une hémolyse ou une dilution du sang avec les liquides tissulaires.

Ne pas appliquer des gouttes de sang successives sur le même cercle préimprimé. Si le flux sanguin diminue avant le remplissage complet de la carte de prélèvement, répéter le prélèvement dans un nouveau cercle.

Ne pas toucher et ne pas frotter les taches de sang.

L'échantillon est ensuite séché à l'air libre pendant 4 heures à température ambiante et stocké dans des enveloppes ou des récipients scellés qui le protégeront de l'humidité, de la lumière, de la chaleur et du contact avec d'autres matériaux.

Organiser le transport de la carte de collecte au laboratoire de contrôle dans les 24 heures suivant la collecte.

Le sang de cordon ne doit pas être utilisé comme échantillon.

Le laboratoire destinataire doit conserver les échantillons à une température entre 2 et 8 °C pour un stockage à court terme à l'abri de l'humidité et de la lumière directe. Pour un stockage à long terme, les échantillons doivent être stockés à une température inférieure à -20°C à l'abri de l'humidité.

Les échantillons doivent être perforées à partir de zones similaires sur chaque goutte de sang séché individuelle. Ne poinçonnez pas les échantillons dans des zones qui comportent des marques imprimées ou qui sont proches des bords de la tache de sang.

9. PROTOCOLE DU TEST

La fiabilité des résultats dépend du strict respect de la procédure décrite.

Suggestion de disposition des plaques d'essai (incluse uniquement à titre indicatif).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C0	C0	Smp									
B	C1	C1										
C	C2	C2										
D	C3	C3										
E	C4	C4										
F	C5	C5										
G	L1	L1										
H	L2	L2										

Procédure manuelle :

Préparation des échantillons

1. Amener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante avant de les utiliser. Tous les réactifs doivent être agités doucement au minimum 15 minutes pour les homogénéiser.
2. Sélectionner le nombre de barrettes de la microplaque requis et placer-les dans le cadre fourni, en tenant compte du nombre de calibrateurs C0-C5, de contrôles L1-L2 et d'échantillons à analyser. Il est recommandé d'analyser les calibrateurs et les contrôles en double.
3. En suivant la disposition suggérée de la plaque, poinçonner les gouttes de sang séché des calibrateurs (C0 à C5) et des contrôles (L1 et L2) dans leurs puits respectifs à l'aide d'un perforateur d'un

diamètre de 3,0 mm. Poinçonner les échantillons de patients dans les puits restants, en notant la position de chaque échantillon de patient dans la plaque. Les gouttes de sang séché doivent être poinçonnées au centre des disques.

Ne pas autoclaver les calibrateurs, les contrôles internes ou les échantillons des patients avant le poinçonnage.

Extraction du PAP

4. Ajouter 100 µL de solution d'extraction dans chaque puits.

Chaque puits doit être examiné visuellement pour s'assurer que les poinçons sont complètement immergés dans la solution.

Couvrir les puits avec un film adhésif pour microplaque pour éviter l'évaporation.

5. Incuber la plaque pendant 1h15 à 37°C sur un agitateur de microplaque à 900 tr/min. (voir paragraphe 6) S'assurer par un contrôle visuel périodique que chaque poinçon est entièrement immergé dans la solution d'extraction.

6. Pendant cette incubation, préparer la solution de lavage et la solution d'anticorps anti-PAP biotinylés (voir section 4).

7. Après l'incubation, vider complètement tous les puits en retournant la plaque. Veiller à ce que tous les échantillons biologiques soient éliminés.

Une vidéo concernant l'élimination adéquate des échantillons biologiques est disponible sur : https://youtu.be/ozS_ADEVnJE



8. Laver chaque puits 3 fois avec 350 µL de solution de lavage diluée. **Une vitesse de rinçage douce est nécessaire pour obtenir de bons résultats (une vitesse de distribution de 100 µL/s est recommandée).**

Après chaque étape de lavage, s'assurer que tous les puits sont vides (liquide restant < 15 µL). Après le dernier lavage, éliminer soigneusement le liquide restant en tapotant la microplaque sur du papier absorbant avant l'étape suivante. **Veiller à bien régler le laveur. Un lavage incomplet ou inefficace entraînera une mauvaise précision et un bruit de fond élevé.**

Formation d'un complexe immunologique

9. Ajouter 100 µL de la solution diluée d'anti-PAP biotinylés dans chaque puits.

10. Couvrir les puits avec un film adhésif pour microplaque.

11. Incuber pendant 2h à 37°C sur un agitateur de microplaques (la vitesse recommandée est de 300 tr/min).

12. Après l'incubation, répétez le lavage comme décrit ci-dessus.

Réaction d'amplification

13. Ajouter 100 µL du conjugué enzymatique prêt à l'emploi dans chaque puits.

14. Couvrir les puits avec un film adhésif pour microplaque.

15. Incuber pendant 20 minutes à température ambiante (15-30°C) sur un agitateur de microplaques (la vitesse recommandée est de 300 tr/min).

16. Après l'incubation, répétez le lavage comme décrit ci-dessus.

Génération de la coloration

17. Distribuer 100 µL de substrat chromogène dans chaque puits.

18. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante en gardant la plaque à l'abri de la lumière, sans agitation.

19. Après l'incubation, arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.

Mesure de l'absorbance

20. Mesurer l'absorbance à 450 nm. Une lecture à double longueur d'onde utilisant 630 nm comme longueur d'onde de référence est recommandée mais pas obligatoire.

L'absorbance doit être mesurée dans les 20 minutes suivant la fin du test.

Puits Réactifs	Cal. (C0-C5)	Contrôle (L1-L2)	Éch.
Calibrateurs	1 x 3,0 mm	----	----
Contrôles	----	1 x 3,0 mm	----
Échantillons	----	----	1 x 3,0 mm
Solution d'extraction	100 µL	100 µL	100 µL
- Couvrir la plaque et incuber pendant 1h15 à 900 tr/min et 37°C - Aspirer et laver 3 x 350 µL			
Anti-PAP biotinylé	100 µL	100 µL	100 µL
- Couvrir la plaque et incuber pendant 2h à 300 tr/minute et 37°C - Aspirer et laver 3 x 350 µL			
Conjugué enzymatique	100 µL	100 µL	100 µL
- Couvrir la plaque et incuber pendant 20 minutes à 300 tr/min à température ambiante - Aspirer et laver 3 x 350 µL			
Substrat chromogène	100 µL	100 µL	100 µL
- Couvrir la plaque et incuber pendant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière			
Solution d'arrêt	100 µL	100 µL	100 µL
- Lecture : 450 nm (630 nm comme référence)			

Procédure automatisée

Préparer les échantillons en suivant les instructions données dans la procédure manuelle (voir la section préparation des échantillons). Préparer les solutions de lavage et d'anticorps anti-PAP biotinylé (voir section 4).

La procédure d'automatisation suit le protocole fourni avec l'automate. Veiller à ce que les poinçons soient retirés manuellement de la microplaque après la première incubation.

Un substrat chromogène, une solution d'arrêt et une solution de lavage supplémentaires peuvent être commandés pour une procédure automatisée utilisant la référence : E-LI-000: Newborn Screening Extra Reagents

Durée avec automate : 4h30

10. CALCUL DES RÉSULTATS

Courbe de titrage

VÉRIFIER LES VALEURS EXACTES DES CALIBRATEURS ET DES CONTRÔLES SUR L'INSERT DISPONIBLE DANS LA BOÎTE DE CHAQUE LOT.

La quantité de PAP dans l'échantillon du patient est calculée à partir d'une courbe standard préparée à partir d'une quantité connue de PAP humaine et calibrée par une méthode interne. Actuellement, aucun matériau de référence standardisé n'est disponible pour le PAP. Les valeurs attribuées aux calibrateurs et aux contrôles peuvent changer d'un lot à l'autre. L'étiquette du lot de calibrateurs et de contrôles doit être consultée pour connaître les valeurs à utiliser dans les calculs.

Les valeurs de concentration de PAP sont exprimées en µg/L.

Utiliser une courbe de régression quadratique (régression polynomiale du 2^e degré) pour calculer les résultats après avoir fait la moyenne d'absorbance de chaque duplicat (le cas échéant).

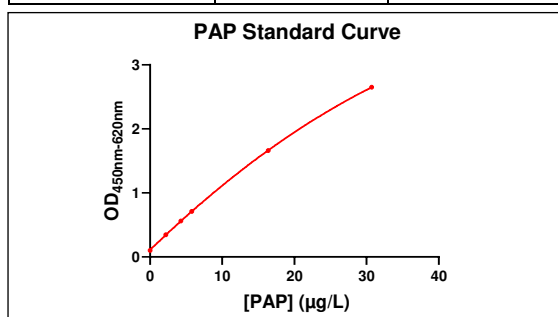
- Axe des x : utiliser la concentration (échelle linéaire)
- Axe des y : utiliser la densité optique (échelle linéaire)

Les résultats typiques d'un test sont présentés ci-dessous. **Cette courbe n'est donnée qu'à titre d'illustration et ne doit pas être utilisée pour calculer les résultats des patients.**

La concentration maximale qui peut être rapportée est limitée par les caractéristiques de performance linéaire du spectrophotomètre utilisé.

Si la valeur de DO du calibrateur le plus élevé est supérieure à la plage de mesure du spectrophotomètre, alors ce calibrateur doit être enlevé du tracé de la courbe. De même, tout échantillon avec une valeur au-delà de la plage de mesure du spectrophotomètre doit être noté comme étant supérieur au plus haut calibrateur acceptable ou doit être dilué.

Calibrateur	[PAP] µg/L	OD 450nm
Cal 0	0	0.101
Cal 1	2.2	0.346
Cal 2	4.3	0.559
Cal 3	5.8	0.712
Cal 4	16.4	1.662
Cal 5	30.7	2.649



11. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les contrôles internes (L1-L2) inclus dans le kit doivent être régulièrement surveillés pour vérifier que les concentrations mesurées sont conformes aux valeurs indiquées. Ces contrôles fournissent des informations précieuses concernant la validité du test selon les spécifications du fabricant.

12. GAMME NORMALE SUGGÉRÉE

Afin d'estimer les valeurs normales et seuils, 1.383 échantillons de sang séché ont été testés. Ces échantillons provenaient du programme de dépistage des nouveau-nés dans la province de Liège (Belgique). Ces échantillons sont tous négatifs pour la mucoviscidose. Une première approche utilisant le 99e centile permet de déterminer un seuil provisoire à 4,06 µg/L.

La gamme normale et les valeurs centiles suggérées ne sont que des lignes directrices. Chaque laboratoire doit établir des seuils et une gamme spécifique en fonction de la performance du test dans son laboratoire et avec sa population démographique constitutive.

N	Médiane (µg/L)	Valeurs centiles			
		95	97,5	99	99,5
1.383	1,24	2,73	3,14	4,06	5,69

13. PERFORMANCES DE L'ESSAI

Les performances sont établies selon la procédure automatisée

a. Limites de détection

La limite de détection (LoD) pour le Neonatal PAP Screening ELISA est de 0,559 µg/L, déterminée selon les directives du document EP17-A2 du CLSI, avec des proportions de α et β risques d'erreur inférieurs à 5% et sur la base de 120 déterminations (60 blancs et 60 échantillons de faible niveau) ; LoB = 0,304 µg/L.

b. Précision

La précision du Neonatal PAP Screening ELISA a été évaluée selon le document EP05-A3 du CLSI.

Il a été réalisé avec des contrôles internes, composés de sang enrichi en PAP à trois concentrations différentes. La définition de la précision est basée sur 80 déterminations (20 jours, 2 tests par jour, 2 réplicats par test) effectuées avec trois lots de réactifs.

Ech.	Moy. (µg/L)	Répétabilité		Inter-série		Inter-jour		Intra-laboratoire	
		SD	CV	SD	CV	SD	CV	SD	CV
1	3,07	0,47	15,2	0,28	9,3	0,22	7,2	0,52	17,0
2	5,32	0,57	10,7	0,40	7,5	0,27	5,2	0,80	15,1
3	7,16	0,61	8,6	0,58	8,1	0,46	6,4	0,97	13,5

Ech. = Echantillon

Moy. = Moyenne

c. Interférences

Le Neonatal PAP Screening ELISA a été évalué pour les interférences selon le document EP7-A2 du CLSI.

Les substances suivantes, ajoutées à du sang enrichi par 1,5 µg/L de PAP, n'ont pas eu d'effet à la concentration indiquée. Il s'agit notamment de médicaments pour nouveau-nés, d'additifs potentiels (tubes de prélèvement), de métabolites biochimiques anormaux et d'un analogue structurel de la PAP.

Un biais inférieur à $\pm 0,2$ µg/L n'est pas considéré comme une interférence significative.

Substance testée	Concentration d'essai	Commentaires
Amoxicilline	95 mg/L	3x concentration sérique moyenne
Céfotaxime	306 mg/L	CLSI EP7-A2, Appendix C
Aciclovir	300 mg/L	3x concentration sérique moyenne ¹⁰
EDTA	1,3 mg/L	CLSI EP7-A2, Appendix C
Héparine	3.000 U/L	CLSI EP7-A2, Appendix C
Bilirubine	150 mg/L	CLSI EP7-A2, Appendix C
Vitamina K ₁	5 mg/L	3x concentration plasmatique des nouveaux nés ¹¹
Reg1A	1,3 µg/L	3x concentration sérique moyenne ¹²

La substance suivante, ajoutée à du sang enrichi par 1,5 µg/L de PAP, s'est avérée interférer au-dessus de la concentration indiquée.

Substance testée	Concentration interférente	Commentaires
Citrate de sodium	8,08 g/L	Mauvais prélèvement*

*si le tube de prélèvement est correctement rempli, la concentration de citrate de sodium dans le sang est comprise entre 3 et 5,5 g/L (volume total 1 :5 ou 1 :10).

14. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

- Le Neonatal PAP Screening ELISA est une méthode de dépistage permettant de mesurer la concentration de PAP dans les échantillons de sang des nouveau-nés. Ce test est conçu pour être utilisé avec des échantillons de sang séché qui sont collectés sur du papier filtre 903® ou 226.
- Des résultats élevés ne sont pas un diagnostic en soi de la mucoviscidose, mais indiquent la nécessité d'un suivi plus approfondi du nouveau-né dont on a reçu un échantillon présumé positif.
- Pour garantir des résultats précis et fiables, il faut s'assurer que tous les poinçons des gouttes de sang se trouvent dans la solution d'extraction pendant la période d'incubation.
- Le strict respect du protocole est conseillé pour obtenir des résultats fiables. Toute modification ou changement apporté au kit ou à la procédure de test est sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Ne pas utiliser de sang de cordon.


- Le sexe, le poids à la naissance et l'âge gestationnel peuvent entraîner de petites différences dans les concentrations de PAP mais n'affectent pas de manière significative le protocole de dépistage.⁸
- Un échantillon prélevé entre 48 et 72 heures d'âge est optimal. Il y a une augmentation des niveaux de PAP liée à l'âge et un prélèvement après 168 heures pourrait conduire à des résultats faussement positifs⁸
- La transfusion sanguine entraîne une augmentation cliniquement significative des niveaux de PAP et un risque plus élevé de résultat faussement positif au test de dépistage. Cela est probablement dû aux niveaux de PAP beaucoup plus élevés trouvés dans le sang des adultes.⁸
- Les nourrissons malades peuvent avoir un dépistage faussement positif en raison d'un stress accru sur le corps.⁸
- Les prématurés ou les nouveau-nés présentant un phénotype de CF léger peuvent présenter un résultat faussement négatif en raison d'une atteinte limitée du pancréas ou de l'immaturité du pancréas.^{4,8}
- Les nouveau-nés atteints d'occlusion intestinale (iléus méconial) peuvent présenter un résultat faussement négatif.³

15. BIBLIOGRAPHY-BIBLIOGRAFÍA-BIBLIOGRAPHIE

1. ORELLE, Beatrice, KEIM, Volker, MASCIOTRA, Luis, *et al.* Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. *The Journal of clinical investigation*, 1992, vol. 90, no 6, p. 2284-2291.
2. PARIKH, Abhirath, STEPHAN, Anne-Fleur, et TZANAKAKIS, Emmanuel S. Regenerating proteins and their expression, regulation, and signaling. *Biomolecular concepts*, 2012, vol. 3, no 1, p. 57-70.
3. SARLES, Jacques, BARTHELLEMY, Sandrine, FÉREC, Claude, *et al.* Blood concentrations of pancreatitis associated protein in neonates: relevance to neonatal screening for cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 1999, vol. 80, no 2, p. F118-F122.
4. SOMMERBURG, Olaf, LINDNER, Martin, MUCKENTHALER, Martina, *et al.* Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not involve DNA testing in a Northern European population. *Journal of inherited metabolic disease*, 2010, vol. 33, no 2, p. 263-271.
5. SOMMERBURG, Olaf, HAMMERMANN, Jutta, LINDNER, Martin, *et al.* Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany. *Pediatric pulmonology*, 2015, vol. 50, no 7, p. 655-664.
6. FARRELL, Philip M., WHITE, Terry B., HOWENSTINE, Michelle S., *et al.* Diagnosis of cystic fibrosis in screened populations. *The Journal of pediatrics*, 2017, vol. 181, p. S33-S44. e2.
7. SARLES, Jacques, BERTHÉZÈNE, Patrice, LE LOUARN, Christian, *et al.* Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *The Journal of pediatrics*, 2005, vol. 147, no 3, p. 302-305.
8. VERNOOIJ-VAN LANGEN, Annette MM, LOEBER, J. Gerard, ELVERS, Bert, *et al.* The influence of sex, gestational age, birth weight, blood transfusion, and timing of the heel prick on the pancreatitis-associated protein concentration in newborn screening for cystic fibrosis. *Journal of inherited metabolic disease*, 2013, vol. 36, no 1, p. 147-154.
9. GRAS-LE GUEN, Christele, BOSCHER, Cecile, GODON, Nathalie, *et al.* Therapeutic amoxicillin levels achieved with oral administration in term neonates. *European journal of clinical pharmacology*, 2007, vol. 63, no 7, p. 657-662.
10. TOD, M., LOKIEC, F., BIDAULT, R., *et al.* Pharmacokinetics of oral acyclovir in neonates and in infants: a population analysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, vol. 45, no 1, p. 150-157.
11. LIPPI, Giuseppe et FRANCHINI, Massimo. Vitamin K in neonates: facts and myths. *Blood transfusion*, 2011, vol. 9, no 1, p. 4.
12. BACON, Siobhan, KYITHAR, Ma Peyh, SCHMID, Jasmin, *et al.* Serum levels of pancreatic stone protein (PSP)/reg1A as an indicator [...]. *BMC endocrine disorders*, 2012, vol. 12, no 1, p. 13.
13. Joanne V Mei, Sherri D Zobel, Elisabeth M Hall, Victor R De Jesus, Barbara W Adam & W Harry Hannon. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis* (2010) 2 (8) 1397-1403


PROYECTO DE RÓTULO EXTERNO

RÓTULO ORIGINAL DEL PRODUCTO




NEONATAL PAP
Screening ELISA

REF E-LC-192


- 1 
- 2 **SORB**|**MTP**
- 1 **CAL** | **CONTROL**
- 1 **EXTR**|**SOLN**
- 4 **Ab**|**BIOT**
- 1 **CONJ**|**HRP**
- 3 **BUF**|**WASH**|**10X**
- 1 **SUBS**|**TMB**
- 1 **H2SO4**|**0,5M**

CE **IVD** $+2^{\circ}\text{C}$ $+8^{\circ}\text{C}$

NEONATAL PAP
Screening ELISA

UDI  05425025460229

LOT **ELC192-XXX**
aaaa-mm-jj

!  $+2^{\circ}\text{C}$ $+8^{\circ}\text{C}$

ZenTech

Zentech s.a.
Liège Science Park, Avenue du Pré-Ailly 10,
4031 ANGLEUR, Belgium
Tel.: + 32 (0)4 361 42.32 Fax : + 32 (0)4 367 00 63
info@zentech.be - www.zentech.be

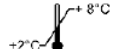
SOBRERÓTULO

Impor :Biodiagnóstico SA.
Ing Huergo 1437 - PB I CABA
D.T.: Laura Mercapide MN6108
AUT POR ANMAT- PM 1201- 381


PROYECTO DE RÓTULO INTERNO

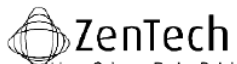
NEONATAL
PAP

CAL CONTROL

IVD 

LOT ELC-BZ-XXX


 aaaa-mm-jj


Liege Science Park - Belgium


NEONATAL
PAP


CONJ HRP


28 mL

IVD 

LOT ELC-AZ-XXX

 aaaa-mm-jj





Liege Science Park - Belgium


NEONATAL
PAP



Ab BIOT


RCNS 300µL H2O

IVD 

LOT ELC-GZ-XXX


 aaaa-mm-jj



Liege Science Park - Belgium

NEONATAL
PAP

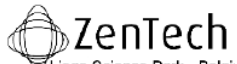
SORB MTP

IVD 

LOT ELC-DZ-XXX


 aaaa-mm-jj

1



Liege Science Park - Belgium

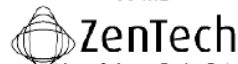
BUF WASH 10X


55 mL

IVD 

LOT EZZ-HZD-XXX

 aaaa-mm-jj



Liege Science Park - Belgium




NEONATAL


EXTR SOLN


55 mL


IVD 


LOT EZZ-LCD-XXX

 aaaa-mm-jj





Liege Science Park - Belgium







SUBS TMB

25 mL

IVD 


LOT GZZ-IE-XXX

 aaaa-mm-jj



Liege Science Park - Belgium


H2SO4 0.5M

28 mL

IVD 

LOT GZZ-KZO-XXX

 aaaa-mm-jj


Liege Science Park - Belgium



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: Bodiagnóstico S.A.

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 19 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.04.09 11:42:38 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.04.09 11:42:39 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: 1-0047-3110-004870-23-0

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Expediente N° 1-0047-3110-004870-23-0

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por Biodiagnóstico S.A. ; se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto con los siguientes datos identificatorios característicos:

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre Descriptivo: Reactivo para determinación de Proteína Asociada a Pancreatitis

Marca comercial: Neonatal PAP Screening ELISA

Modelos:

Neonatal PAP Screening ELISA

Indicación/es de uso:

Neonatal PAP Screening ELISA es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de la proteína asociada a pancreatitis (PAP) en recién nacidos utilizando muestras de sangre seca en papel de filtro 903. Este kit

se utiliza como medio para identificar recién nacidos que tienen un mayor riesgo de padecer fibrosis quística (FQ).

Forma de presentación: Kit para 192 determinaciones: 2x (12 tiras x 8 pocillos) contiene:

1. Placa de microtitulación recubierta: pocillos recubiertos con anticuerpos anti-PAP humana policlonales.
2. Calibradores y controles, manchas de sangre: bolsa de aluminio con los calibradores C0-C5 y los controles internos L1-L2 (manchas de sangre seca en papel de recogida de muestras 903®/226, utilizando una matriz humana que contiene una cantidad específica de PAP humana).
3. Solución de extracción: tampón listo para el uso con albúmina de suero bovino (BSA) y Tween® 20. Conservante: ProClin™ 300 0,05%.

4. Anti-PAP biotinilado: anticuerpo anti-PAP humano biotinilado liofilizado.

Rehidratar con 300 µL de agua destilada fresca y libre de gérmenes (agitar min. 15 min. con vórtex o rodillo). Diluir la solución concentrada 1:24 con el tampón de extracción, por ejemplo, 300 µL + 6900 µL = 7200 µL. Conservante: ProClin™ 300 0,015%..Estabilidad después de la reconstitución: 12 días a 2-8°C.

5. Conjugado enzimático: complejo estreptavidina-peroxidasa en una solución estabilizadora. Conservante: ProClin™ 300 0,05%.

Listo para el uso. La conservación del conjugado a bajas temperaturas (2-8°C) puede provocar la formación de un precipitado blanco. Este precipitado se disuelve bajo agitación a temperatura ambiente.

6. Solución de lavado: Tampón de fosfato con detergente, concentrado x 10. Conservante: Timerosal 0,1%. Diluir la solución concentrada 1:10 con agua destilada o desionizada limpia y sin gérmenes, por ejemplo 55 ml + 495 ml = 550ml. La conservación de la solución de lavado concentrada a bajas temperaturas (2-8°C) puede provocar la formación de cristales. Estos cristales se disuelven mediante calentamiento (37°C) o dilución a la concentración de trabajo.

Estabilidad después de la dilución: 10 semanas a temperatura ambiente (20-25°C).

7. Sustrato cromogénico: TMB (3.3'-5.5' tetrametilbencidina). Listo para el uso.

8. Reactivo de bloqueo: H₂SO₄, 0,5M. Listo para el uso.

Período de vida útil: 15 meses Conservación de 2-8°C

Nombre del fabricante:

ZenTech s.a.

Lugar de elaboración:

Liege Science Park, Avenue du Pre-Aily, 10,4031 Angleur
Belgica

Grupo de Riesgo: Grupo C

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 1201-381 , con una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la Disposición autorizante.

N° 1-0047-3110-004870-23-0

N° Identificadorio Trámite: 51751

AM

Digitally signed by PEARSON Enriqueta María
Date: 2024.04.26 19:08:10 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.04.26 19:08:12 -03:00