PLT Gp/Receptors

Quantitative Diagnostik von Plättchen-Glykoprotein-Abnormalitäten
Für die In-vitro-Diagnostik

Kit für 5 Bestimmungen CE **Artikelnr.: 7004**

Außerhalb Europas ist dieses Produkt nur für Forschungszwecke bestimmt.

1 EINLEITUNG

Plättchen spielen bei der Reparatur der Gefäßwände nach Verletzung eine zentrale Rolle. Die Aggregation der Plättchen und die Adhäsion an die Gefäßwände werden über Zelloberflächen-Glykoproteine vermittelt.

Bei zwei bekannten Blutungsstörungen ist entweder eine reduzierte Expression oder ein funktioneller Defekt eines der Haupt-Glykoprotein-Komplexe involviert:

- Glanzmann Thrombasthenie, hierbei ist die GpIIb/IIIa-Expression betroffen, der Schweregrad hängt vom GpIIb/IIIa-Expressionsgrad ab [2],
- Bernard-Soulier Syndrom, ein quantitativer oder qualitativer Defekt des GpIb/IX/V-Komplex [1] [4] [7].

Der GMP140 (P-selectin, PADGEM)-Expressiongrad ist ein Maß für den Aktivierungszustand der Plättchen: Ruhende Plättchen exprimieren wenig GMP140, nach Aktivierung wird vermehrt GMP140 exprimiert. Die GMP140-Expression nach In-vitro-Aktivierung ist ein Marker für die Plättchenreaktivität. Für einige Plättchen-α-Granula-Defizienzen ist eine reduzierte GMP140-Sekretion nach Plättchenaktivierung charakteristisch.

Der **PLT Gp/Receptor**-Test ermöglicht eine präzise Quantifizierung der GpIIb-, GpIbα- und GMP140-Glykoproteine auf der Plättchenoberfläche, im ruhenden Zustand und nach TRAP (Thrombin Receptor Agonist Peptide)-Aktivierung.

Der Test erkennt konstitutive Thrombozytopathien, bei denen ein quantitativer Glykoproteindefekt und Defekte der Plättchereaktivität beteiligt sind.

2 PRINZIP

Die Probe wird in Anwesenheit oder Abwesenheit von TRAP verdünnt. Nach der Verdünnung wird diese Probe mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (mAb), die gegen humanes GpIIb, GpIbα und GMP140 gerichtet sind, sowie eine isotypische Negativkontrolle inkubiert.
Nach Zugabe eines Färbereagenz zu den Proben- und Kalibrierungsansätzen, wird die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) mit einem Durchflusszytometer gemessen. Durch den Kalibrator, der mit definierten ansteigenden Mengen der monoklonalen Antikörper beschichtet ist, kann die MFI in absolute Mengen von gebundenem Antikörper pro Plättchen umgerechnet werden (ABC: Antibody Binding Capacity). Die Ergebnisse werden als sABC (spezifische ABC) angegeben. In diesem Testsystem ist dies ein Äquivalent für die Anzahl von Gp-Oberflächen-Molekülen pro Plättchen.

3 KIT REAGENZIEN

- **Reagenz 1:** 1 x Fläschchen, 15 mL, Verdünnungsmittel, 10 fach konzentriert.
- **Reagenz 2a:** 1 x Fläschchen, 200 µL, isotypische Negativkontrolle (monoklonaler Maus-Antikörper, IgG)
- **Reagenz 2b:** 1 x Fläschchen, 200 µL, anti-GMP140-MAb (CD62P)
- **Reagenz 2c:** 1 x Fläschchen, 200 µL, anti-GpIIb-MAb (CD41)
- **Reagenz 2d:** 1 x Fläschchen, 200 µL, anti-GpIb-MAb (CD42b)
- **Reagenz 3:** 1 x Fläschchen, 200 µL, kalibrierte Beadsuspension. Die Beads sind mit steigenden genau bekannten Mengen an Maus-IgG beschichtet. Die Beschichtungsmenge für jede Bead-Population ist im Kalibierungs-Flyer, der im Kit enthalten ist, angegeben. Diese Mengen können von Lot zu Lot abweichen.
- **Reagenz 4:** 1 x Fläschchen, 0.9 mL, Färbereagenz, polyklonaler Anti-Maus-IgG-FITC.
- **Reagenz 5:** 1 x Fläschchen, TRAP, lyophilisiert, (60 nmol / Fläschchen).

4 NOTWENDIGE MATERALIEN, DIE NICHT MITGELIEFERT WERDEN

- Vortex
- Timer
- Durchflusszytometer
- Verstellbare Pipetten mit Einwegspitzen (20 µL - 1 mL)
- Pipetten (2 - 25 mL)
- Hämolyseröhrchen für Durchflusszytometer
- Destilliertes Wasser, deionisiertes Wasser oder Wasser für Injektionsmittel

5 REKONSTITUTION UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Das ungeöffnete Test-Kit und dessen Inhalt können bei 2 bis 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum aufbewahrt werden.

- **Reagenz 1 ****

Stabilität nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8 °C, wenn keinerlei Kontamination vorliegt.
1:10-Verdünnung mit destilliertem Wasser herstellen und die für die Bestimmung benötigte Volumenmenge herstellen. Stabilität nach der Verdünnung: 15 Tage bei 2-8 °C.

- **Reagenz 2a, 2b, 2c, 2d und 4**

Gebrauchsfertig. Stabilität nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8 °C, wenn keinerlei Kontamination vorliegt.

- **Reagenz 3**

Gebrauchsfertig. **Reagenz mit dem Vortex vor dem Gebrauch für 5 sec kräftig mischen.**
Stabilität nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8 °C, wenn keinerlei Kontamination vorliegt.

- **Reagenz 5**

Mit **500 µL** verdünntem Reagenz 1 resuspendieren.
Stabilität nach der Rekonstitution: 1 Monat bei 2-8° C.

Hinweise:
* Das Test-Kit **nicht** einfrieren.
** **Das Vorhandensein von Kristallen hat keinen Einfluss auf die Qualität der Reagenzien. Falls Kristalle auftreten, Reagenzien bei 37 °C inkubieren, bis die Kristalle vollständig gelöst sind.**

6 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Einhaltung der allgemeinen Laborvorschriften.
- Einhaltung der gesetzlichen Vorschriften zur Abfallentsorgung.
- Blut ist als potenziell infektiös anzusehen.
- Alle Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid und müssen unter Einhaltung von Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Wenn diese Lösungen über das Spülbecken entsorgt werden, müssen sie mit einer großen Menge Wasser verdünnt werden, um die Bildung von Metallaziden zu vermeiden, die bei entsprechender Konzentration zur Explosion führen können.

7 PROBENAHME UND BEARBEITUNG VON PROBEN

- **Probenahme:**

- Nicht benetzbare Blutabnahmeröhrchen aus Kunststoff verwenden.
- Die Thrombozyten müssen völlig unversehrt bleiben. Die Aktivierung der Thrombozyten bei Probenahme ist unbedingt zu vermeiden (z.B. durch Schütteln oder Thermoschock).
- Antikoagulationsmittel: **Natriumzitrat 0,109 M oder 0,129 M** (9 Volumen Blut, 1 Volumen Zitrat verwenden).

- **Probenlagerung:**

- Blutproben müssen nach der Blutabnahme zur Stabilisierung 1 Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt werden (18-25°C).
- Dann muss die Probe innerhalb der nächsten 5 Stunden verarbeitet werden.
- Proben nicht einfrieren.

8 VERFAHREN

Hinweis: Um gute Ergebnisse zu erzielen sollte beim Pipettieren von **kleinen Volumina (20 µL)** darauf geachtet werden**, dass die Reagenzien direkt auf den Röhrchenboden pipettiert werden.**
Für die Durchführung des Tests müssen alle Reagenzien Raumtemperatur besitzen.

8.1. Vorbereitung der Röhrchen und der Probe

- Auf einem Gestell 11 Kunststoffröhrchen mit T1 bis T11 beschriften.

Die Reagenzien wie folgt in die Röhrchen verteilen:
- In Röhrchen T1: **50 µL** verdünntes Reagenz 1 pipettieren.
- In Röhrchen T2: **50 µL** rekonstituiertes Reagenz 5 pipettieren.
- In Röhrchen T3 und T7: **20 µL** Reagenz 2a pipettieren.
- In Röhrchen T4 und T8: **20 µL** Reagenz 2b pipettieren.
- In Röhrchen T5 und T9: **20 µL** Reagenz 2c pipettieren.
- In Röhrchen T6 und T10: **20 µL** Reagenz 2d pipettieren.
- In Röhrchen T11: **40 µL** Reagenz 3 pipettieren, dieses zuvor kräftig mit dem Vortex mischen.

8.2. Plättchen Aktivierung

In Röhrchen T1 und T2:

- **50 µL** Gesamtblut pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex homogenisieren**.**
- **5 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
- **500 µL** verdünntes Reagenz 1 zugeben.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex homogenisieren

8.3. Proben-Immunmarkierung

In Röhrchen T3 bis T6 :

- **20 µL** der verdünnten Probe aus Röhrchen T1 pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex homogenisieren**.**

In Röhrchen T7 bis T10:

- **20 µL** der aktivierten Probe aus Röhrchen T2 pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex homogenisieren**.**

Die Röhrchen T3 bis T10 für **10 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.

8.4. Fluoreszenzmarkierung

In Röhrchen T3 bis T11:

- **20 µL** Reagenz 4 pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex homogenisieren**.**
- **10 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
- **2 mL** verdünntes Reagenz 1 zugeben.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex homogenisieren und die Röhrchen sofort bei 2-8°C bis zur Messung aufbewahren.

Die so vorbereiteten Proben können vor der Durchflusszytometrie **4 Stunden** bei **2-8 °C** aufbewahrt werden.

8.5. Durchflusszytometrische Analyse

Für die Analyse der Messungen ist das Anwendungsprotokoll des Herstellers des verwendeten Durchflusszytometers zu berücksichtigen.

Für die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wird der geometrische Mittelwert (Mn (y) oder der GeoMean, je nach Durchflusszytometer) herangezogen.

Hinweise: die Beckman Coulter Software Expo™ 32, CXP und RXP haben die Option "Baseline offset". Diese sollte auf „OFF" gesetzt werden.

Vor der Analyse jedes Röhrchen 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex durchmischen.

● Kalibrierung: Röhrchen T11 (Abb. 1)

Ein Zytogramm FS LOG vs SS LOG erstellen. Um unspezifischen Hintergrund zu minimieren einen Schwellenwert bei FS LOG einfügen.

Um die Einzel-Bead-Population das Analysefenster „CAL" einzeichnen (Abb. 1a)

Von der im Analysefenster „CAL" eingegrenzten Population ein Histogramm FL1 LOG erstellen. Die MFI der 3 Fluoreszenzpeaks (Fig. 1b : A, B und C Markierung) entspricht den 3 Kalibrierungs-Beads.

Für eine korrekte Analyse müssen im Fenster "CAL" mindestens 8000 Beads analysiert werden.

Für eine optimale Auswertung, muss die Fluoreszenzintensität (FL1) der dritten Bead-Population am Anfang der vierten Dekade liegen. Zu diesem Zweck die Spannung des Fotomultiplikators FL1 entsprechend einstellen.

Die "A"-Markierung muss den ersten Kanal beinhalten.

Abb. 1a : Kalibrierungs-Zytogramm

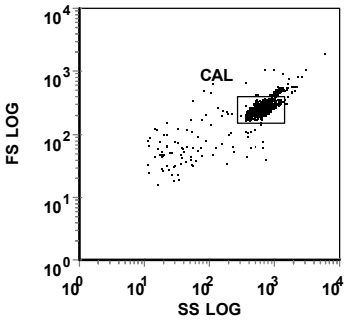
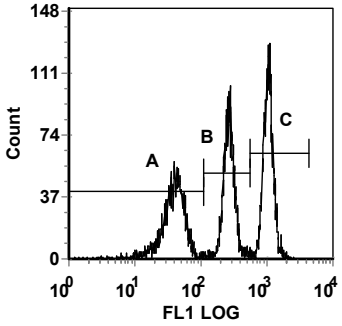


Abb.1b : Positionierung der Auswertungsmarkierungen im Fluoreszenz-Histogramm



● Probenanalyse: Röhrchen T3 bis T10 (Abb. 2)

Die Proben werden mit den identischen Messeinstellungen für FS LOG vs SS LOG vermessen. Durch das Analysenfenster „PLT" werden die Plättchen von den anderen Blutzellen isoliert (Fig. 2a). Es ist darauf zu achten, dass die Plättchen-Population durch die Schwellenwert-Einstellung nicht abgeschnitten wird.

Im Fenster "PLT" müssen mindestens 3000 Zellen analysiert werden. Von den im Analysefenster „PLT" eingegrenzten Plättchen ein Histogramm FL1 LOG erstellen und die MFI für jede Probe erfassen (Abb. 2b and 2c). **Eine gute Auswertung ermöglicht mindestens 50% positive Zellen in dem Analysefenster "PLT" zu erhalten.**

Für schwach exprimierte Marker (isotypische Negativkontrolle, GMP 140 ruhender zustand) wird die MFI über die gesamte Plättchenpopulation gemessen (Abb. 2b).

Abb. 2a : Positionierung des "PLT"-Analysefensters

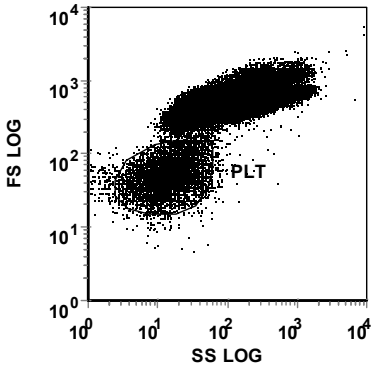
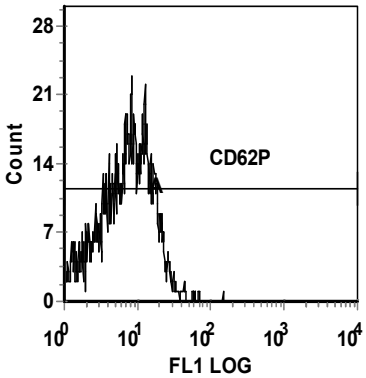
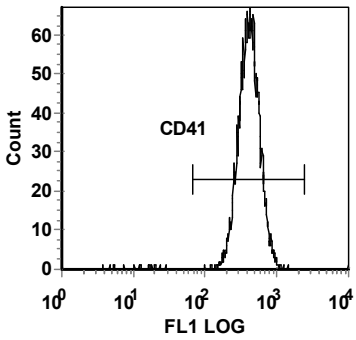


Abb. 2b : CD62P-Färbung: Auswertungsmarkierung



Für deutlich exprimierte Marker (GMP 140 aktivierter zustand, GpIIb und GpIbα), wird nur die MFI des positiven Peaks gemessen (Abb. 2c).

Abb. 2c : CD41-Färbung: Auswertungsmarkierung



8.6 Ergebnisse und Testauswertung

Computergestützte oder graphische Datenanalyse.

Für die Standardkurve wird eine doppelt-logarithmische (LOG_{10}) Darstellung gewählt. Der MFI der 3 Kalibrierungs-Beads (Röhrchen T11) wird auf der Abszisse (x-Achse) und der korrespondierende Wert des monoklonalen Antikörpers (angegeben auf dem Kalibrierungsbeiblatt) auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen.

Die optimale Standardkurve wird entsprechend der folgenden Formel eingezeichnet: $LOG_{10}(ABC) = a \times LOG_{10}(MFI) + b$

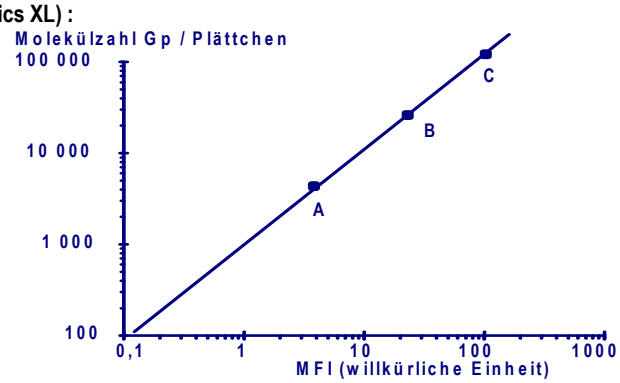
Für die Proben T3 bis T10 wird die Zahl der gebundenen mAk-Moleküle (ABC : Antibody Binding Capacity) anhand der MFI-Werte direkt aus der Standardkurve interpoliert.

Die spezifischen quantitativen Werte (sABC : specific Antibody Binding Capacity) werden durch Subtraktion der isotypischen Negativkontrolle wie folgt berechnet.

Beispiel:

$sABC_{CD41} = ABC_{CD41}$ (Röhrchen T5) – $ABC_{\text{isotypische Negativkontrolle}}$ (Röhrchen T3).

Beispiel einer Standardkurve (für ein Beckman-Coulter-Instrument Typ Epics XL) :



9 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die spezifischen quantitativen Werte werden berechnet und mit den zu erwartenden Werten einer Normal-Population verglichen. Wir empfehlen, dass jedes Labor seine eigenen Normalwerte ermittelt. **Hierzu sollte eine lokale Population gesunder Spender entsprechenden Alters wie die zu testenden Patienten herangezogen werden.**

Von 40 gesunden erwachsenen Spendern bestimmte Werte (angegeben in sABC).

	Ruhender Zustand	*Aktivierter Zustand*
GMP 140 (CD62P)	< 1,000	≥ 1,000
GpIIb (CD41a)	51,000 +/- 14,000	85,000 +/- 27,000
GpIbα (CD42b)	38,000 +/- 11,000	19,000 +/- 10,000

Diese Werte können nicht auf Kinder übertragen werden (Altersbereich von 0 bis 18 Jahre). Plättchen-Glykoproteine sind bei Kindern unterschiedlich exprimiert und die Expression ist altersabhängig[5].

Beispiel: Werte von Glanzmann Thrombasthenia Syndromen [2] (sABC) :

		Ruhender Zustand	*Aktivierter Zustand*
Homozygot 1	GMP 140 (CD62P)	< 1,000	6,000
	GpIIb (CD41a)	1,300	2,000
	GpIb (CD42b)	41,000	32,000
Heterozygot 2	GMP 140	< 1,000	11,600
	GpIIb	28,000	51,000
	GpIb	40,000	33,000
Heterozygot 3	GMP 140	< 1,000	9,700
	GpIIb	25,000	49,000
	GpIb	31,000	13,000

Beispiel: Werte vom Fechtner Syndrom [2] (sABC) :

	Ruhender Zustand	*Aktivierter Zustand*
GMP 140 (CD62P)	< 1,000	19,200
GpIIb (CD41a)	137,000	204,000
GpIb (CD42b)	111,000	43,000

10 LEISTUNGEN

Das **PLT Gp/Receptors-**Test-Kit wurde auf den folgenden Geräten validiert: Becton-Dickinson-Instrument Typ FACSCalibur und Beckman-Coulter Typ XL und XL MCL (System II™ software).

- **Testspezifität :**

Das **PLT Gp/Receptors**-Test-Kit wurde mit Proben von konstitutiven Thrombozytopathien getestet. Die Testergebnisse korrelieren exakt mit den klinischen Daten und genetischen Tests [2] [3].

- **Reagenzienspezifität:**

Reagenz 2a: monokl. Antikörper ist nicht gegen ein humanes Epitop gerichtet.
Reagenz 2b: Antikörper ist spezifisch für GMP140 [6].
Reagenz 2c: Antikörper ist spezifisch für CD41 (Leucocyte Typing V) [8].
Reagenz 2d: Antikörper ist spezifisch für CD42b (Leucocyte Typing V) [8].

- **Wiederholbarkeit** :

Normale Proben (n=2) wurden 5 mal mit dem selben Kit getestet (sABC) :

		Ruhender Zustand			*Aktivierter Zustand*		
		Mean	**SD**	**VK**	**Mean**	**SD**	**VK**
A	**GMP140**	< 1,000	-	**-**	12,580	860	***6.8 %***
	GpIIb	64,350	1,970	***3.1 %***	110,700	6,080	***5.5 %***
	GpIb	44,205	1,020	***2.3 %***	23,210	880	***3.8 %***
B	**GMP140**	< 1,000	-	**-**	15,350	910	***5.9 %***
	GpIIb	55,720	960	***1.7 %***	94,570	6,780	***7.2 %***
	GpIb	40,810	1,190	***2.9 %***	22,920	1,050	***4.6 %***

- **Inter-Chargen Reproduzierbarkeit (sABC) :**

Eine Probe wurde zweimal mit zwei verschiedenen Chargen getestet:

		Ruhender Zustand		*Aktivierter Zustand*	
GMP140 (CD62P)	**Charge 1**	< 1,000	< 1,000	13,860	14,230
	Charge 2	< 1,000	< 1,000	14,630	15,010
GpIIb (CD41)	**Charge 1**	56,540	55,470	102,820	96,550
	Charge 2	54,570	55,230	86,470	91,920
GpIb (CD42b)	**Charge 1**	36,390	37,560	20,530	22,900
	Charge 2	40,060	40,080	21,350	22,570

11 GRENZEN DES TEST-KITS

Mit dem PLT Gp/Receptors-Test-Kit können nur Proben vermessen werden, die die folgenden Kriterien erfüllen:

-Proben dürfen nicht hämolysiert sein.
-Plättchen dürfen nicht aktiviert sein. Als Grenzwert gilt eine basale Expression von CD62P kleiner als 1000 sABC.
-Abwesenheit von GpIIIa-Antagonisten-Therapie. Im Zweifelsfall kann dies mit dem PLATELET GpIIb/IIIa Occupancy kit (BioCytex, Ref. 7001), bestimmt werden.
-Abwesenheit von Anti-Plättchen-Auto- und Allo-Antikörpern.

12 HAFTUNG

Für die ordnungsgemäße Verwendung im Rahmen der In-vitro-Diagnostik sind die Anweisungen in der Anleitung strikt zu befolgen. Jede Modifizierung des Protokolls kann die Testergebnisse beeinflussen. Es dürfen keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen gemischt werden. In diesem Fall sind Reklamationen bzw. der Austausch des Produktes ausgeschlossen.

13 LITERATURNACHWEIS

1. MORAN N. *et al*., "Surface expression of glycoprotein Ib alpha is dependent on GpIb beta: evidence from a novel mutation causing Bernard-Soulier syndrome". Blood (2000), 96, 532-539.
2. SCHLEGEL N. *et al.,* "The interest of quantitative flow cytometry kits for the identification and characterization of inherited platelet disorders", Blood (1998) Suppl. 1, 92, Abst. 3367.
3. SCHLEGEL N. *et al*., "Is X-linked familial thrombocytopenia (XLT) a pure platelet variant of Wiskott Aldrich Syndrome (WAS)." Thromb. Haemost. (1999) Suppl. 797, Abst. 2524.
4. BUNESCU A. *et al*., "Partial expression of GpIb measured by flow cytometry in two patients with Bernard-Soulier syndrome" Thromb. Res. (1994), 76, 441-450.
5. HEZARD N. *et al*., "Unexpected persistence of platelet hyporeactivity beyond the neonatal period: a flow cytometric study in neonates, infants and older children". Thromb. Haemost. (2003), 90, 116-23.
6. PARMENTIER S. *et al*., "Inhibition of Platelet functions by a monoclonal antibody (Lyp20) directed against a granule membrane glycoprotein (GMP140 / PADGEM)". Blood (1991), 77, 1734-1739.
7. DROUIN J. *et al*. "Compound heterozygosity for a novel nine-nucleotide deletion and the Asn45Ser Missense Mutation in the Glycoprotein IX in a patient with Bernard-Soulier Syndrome" Am. J. of Hematol. (2005) 78: 41-48.
8. SCHLOSSMAN, S.F. *et al. -Eds,* Leucocyte Typing V, Oxford University Press (1995).

14 SYMBOLE

REF	*Bestellnummer*		*Verwendbar bis*
IVD	*In vitro Diagnostikum*	Σ	*Inhalt ausreichend für "n" Bestimmungen*
	Temperaturbegrenzung	LOT	*Chargenbezeichnung*

BIOCYTEX
140 ch. ARMEE D'AFRIQUE
13010 MARSEILLE
FRANCE
TEL : +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX : +33 (0) 4 91 47 24 71

Version Mai 2010