

CY-QUANT VASP/P2Y12

Für die Bestimmung plättchenspezifischer ADP-Rezeptor-Antagonisten

Inhalt des Testkits:

- 1 Mikrotiterplatte mit Reagenz 1 (96 mit anti-VASP beschichtete Wells)
- 3 Fläschchen Reagenz 2a (PGE1)
- 3 Fläschchen Reagenz 2b (PGE1 + ADP)
- 1 Fläschchen Reagenz 3 (Lysepuffer)
- 1 Fläschchen Reagenz 4 (Waschlösung)
- 1 Fläschchen Reagenz 5 (Verdünnungspuffer)
- 1 Fläschchen Reagenz 6 (Anti-VASP-P-Peroxydase)
- 1 Fläschchen Reagenz 7 (TMB)
- 1 Fläschchen Reagenz 8 (Stopplösung)
- 1 Werkzeug zur Entnahme der Wells aus ihren Streifen

In-vitro-Diagnostikum

Best.-Nr. 7502



1- EINFÜHRUNG

CY-QUANT VASP/P2Y12 ist ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) zur Bestimmung des phosphorylierten VASP-Moleküls im Serin 239 (VASP-P) in Plättchen aus frischem humanem Vollblut.

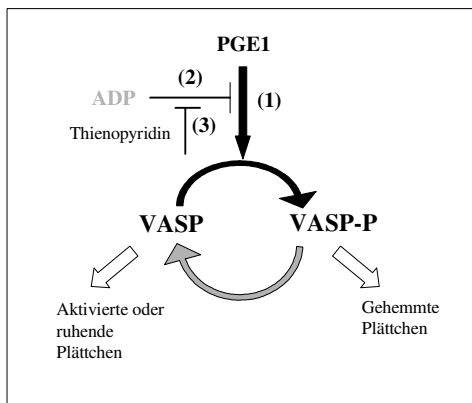
CY-QUANT VASP/P2Y12 dient zur Bestimmung der plättchenspezifischen ADP-Rezeptor-Antagonisten P2Y12.

Das intrathrombozytäre Protein VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) ist im Basalzustand nicht phosphoryliert.

Das Prostaglandin E1 (PGE1) induziert die Phosphorylierung des VASP (1), während die Bindung des Adenosindiphosphats (ADP) an die Rezeptoren P2Y12 (2) zur Dephosphorylierung des VASP führt. Unter den Testbedingungen und bei gleichzeitigem Hinzusetzen von PGE1 und ADP überwiegt die Wirkung des ADP und induziert die Dephosphorylierung des VASP, es sei denn, der P2Y12-Rezeptor wird wirksam von Thrombozytenaggregationshemmern (wie Thienopyridinen), die auf diesen Rezeptor abzielen, blockiert. Das Phosphorylierungsniveau des VASP spiegelt unter diesen Bedingungen somit das Inhibitionsniveau des Rezeptors P2Y12 wieder.

Interindividuelle Variationen und Resistenzerscheinungen gegenüber Anti-thrombozytika wurden ausführlich dokumentiert (a,b). Die Wirkung der Thienopyridine (3) kann mit dem Assay **CY-QUANT VASP/P2Y12** anhand der durch die PGE1 induzierten Persistenz der VASP-Phosphorylierung trotz gleichzeitigen ADP-Zusatzes nachgewiesen werden.

Der Assay **CY-QUANT VASP/P2Y12** kann auch zur Beurteilung der *in vitro*-Wirkungen der Rezeptorantagonisten P2Y12 verwendet werden.



2- TESTPRINZIP

Nach einer ersten Aktivierungsetappe der Vollblutprobe parallel durch PGE1 und PGE1+ADP (Reagenzien 2a und 2b) werden die Plättchen gelyst (Reagenz 3), das somit freigesetzte VASP wird von einem beschichteten humanen Anti-VASP in der Mikrotiterplatte eingefangen (Reagenz 1). Dann lagert sich ein mit der Peroxydase (Reagenz 6) gekoppeltes humanes Anti-VASP-P an eine Antigen determinante des VASP, das phosphorylierte Serin 239, an. Der gebundene Peroxydasegrad wird nun anhand seiner Aktivität auf das Substrat TMB (Reagenz 7) gemessen. Nach dem Abstoppen der Reaktion (Reagenz 8) besteht eine direkte Beziehung zwischen der Intensität des Signals (Extinktion bei 450 nm) und der Konzentration des in der Probe enthaltenen VASP-P.

Ein **Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI)** wird aus den optischen Dichten (OD_{450nm}) der in Gegenwart von PGE1 allein [PGE1] oder PGE1 und ADP [PGE1 + ADP] getesteten Proben errechnet.

3- REAGENZIEN

- **Reagenz 1:** Mikrotiterplatte 96 Wells bestehend aus 12 abtrennbaren Streifen mit je 8 einzelnen, mit murinen mAK gegen humanes VASP beschichteten Wells in einer wiederverschließbaren Verpackung.
- **Reagenz 2a:** Fläschchen lyophilisiertes PGE1.
- **Reagenz 2b:** Fläschchen lyophilisiertes PGE1 + ADP.
- **Reagenz 3:** Fläschchen 15 ml Lysepuffer.
- **Reagenz 4:** Fläschchen 50 ml Waschlösung, 20fach konzentriert.
- **Reagenz 5:** Fläschchen 50 ml Verdünnungspuffer.
- **Reagenz 6:** Fläschchen 1,6 ml murine mAK gegen humanes VASP-P, mit Peroxydase gekoppelt, 20 fach konzentriert.
- **Reagenz 7:** Fläschchen 25 ml TMB (Tetramethylbenzidin).
- **Reagenz 8:** Fläschchen 15 ml Stopplösung.

4- ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHES; NICHT MITGELIEFERTES MATERIEL

- Entionisiertes oder destilliertes, auf Raumtemperatur gebrachtes, vorzugsweise steriles Wasser.
- Chronometer.
- Mehrkanalpipetten, Pipetten mit Einmalspitzen.
- Plattenablesegerät mit Filter bei 450 nm.
- Rührgerät vom Typ Vortex.
- Absorbierendes Papier.

5- VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die guten Laborpraktiken sind zu beachten.
- Die Abfälle sind nach den geltenden örtlichen Vorschriften zu entsorgen.
- Das Blut ist als potentiell infektiös zu betrachten.
- Reagenz 3 – Lysepuffer:
 - H319:** Verursacht schwere Augenreizung
 - H333:** Kann bei Einatmen gesundheitsschädlich sein
 - EUH208:** Enthält 5-chloro-2-methyl-4-isothiazol-3-one/2-methyl-4-isothiazol-3-one (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen
 - P280:** Schutzhandschuh / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen
 - P305 + P351 + P338:** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen
 - P304 + P340:** BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen
- Reagenz 5 – Verdünnungspuffer:
 - H317:** Kann allergische Hautreaktionen verursachen
 - P280:** Schutzhandschuh / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen
 - P302 + P352:** BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen

- Reagenz 8 – Stopplösung:

H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden

P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen

P301 + P330 + P331: BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen

P303 + P361 + P353: BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle verschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen

P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen

P310: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen

6- REKONSTITUTION UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bei Aufbewahrung bei 2-8°C in ihrer Originalverpackung sind die Reagenzien bis zum angegebenen Verfalldatum haltbar.

- Vor der Anwendung müssen alle Reagenzien mindestens 30 Minuten lang auf Raumtemperatur (RT, 18-25°C) gebracht werden.

• Reagenz 1

Gebrauchsfertig. Nach der ersten Anwendung die nicht benutzten Streifen und Wells sofort wieder in die wiederverschließbare Verpackung mit dem Trockenmittel zurücklegen und bei 2-8 °C lagern.

Haltbarkeit nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8°C, sofern keine Kontamination stattfindet.

• Reagenzien 2a und 2b

Jedes Fläschchen mit **900 µl** entionisiertem oder destilliertem Wasser ansetzen und den Inhalt mit einem Rührgerät vom Typ Vortex 5 Sekunden lang homogenisieren.

Haltbarkeit nach dem Ansetzen: 1 Monat bei 2-8°C, sofern keine Kontamination stattfindet.

• Reagenzien 3, 5 und 8

Gebrauchsfertig. Haltbarkeit nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8°C, sofern keine Kontamination stattfindet.

• Reagenz 4

Haltbarkeit nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8°C, sofern keine Kontamination stattfindet.

Vor der Verwendung mit entionisiertem oder destilliertem Wasser auf **1/20** verdünnen.

Pro Well 100 µl **Reagenz 4** mit 1 900 µl entionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen.

Haltbarkeit nach Verdünnung: 15 Tage bei 2-8°C, sofern keine Kontamination stattfindet.

Bemerkung: Das Vorhandensein von Kristallen beeinträchtigt die Qualität des Reagenzes nicht. Gegebenenfalls bei 37°C inkubieren bis zur völligen Auflösung der Kristalle, dann homogenisieren und auf RT bringen.

• Reagenz 6

Haltbarkeit nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8°C, sofern keine Kontamination stattfindet.

Vor Gebrauch das Reagenz mit dem **Reagenz 5** auf **1/20** verdünnen.

Pro Well 15 µl **Reagenz 6** mit 285 µl **Reagenz 5** verdünnen.

Haltbarkeit nach der Verdünnung: 1 Stunde bei RT.

Bemerkung: Die Fläschchen sind bis zum Rand gefüllt, daher vorsichtig pipettieren, damit das Reagenz nicht überläuft.

• Reagenz 7

Gebrauchsfertig. Haltbarkeit nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8°C, sofern keine Kontamination stattfindet.

Bemerkung: Vor Licht- und Wärmeeinwirkung schützen, jede Kontamination mit Metallionen oder Peroxydase vermeiden.

7- PROBENENTNAHME UND AUFBEWAHRUNG

- Venöses Vollblut nach den Empfehlungen des Herstellers in ein Entnahmeröhrchen mit **Natriumcitrat 0,109 M** entnehmen.

- Sämtliche Plättchen erhalten unter Vermeidung aller Aktivierungsrisiken während der Entnahme (Schütteln, Wärmeschock).

- Das Röhrchen muss bis zum Rand gefüllt sein, bei RT aufbewahrt werden und darf vor dem Test nicht geöffnet werden.

- Die Probe muss innerhalb von **24 Stunden** nach der Entnahme verarbeitet werden.

8- TESTDURCHFÜHRUNG

Wir empfehlen das Testen einer normalen Probe als Kontrolle parallel zu jeder Probenserie.

Bemerkungen:

- Die Waschvorgänge können entweder manuell (Mehrkanalpipette) oder mit einem automatischen Plattenwaschgerät erfolgen.

- Bei jedem manuellen Waschen die Wells durch Umdrehen der Platte leeren, die Platte auf sauberem, absorbierendem Papier abtupfen, die Wells mit 300 µl verdünntem Reagenz 4 füllen und dann völlig leeren.

- Die angegebene Zahl der Waschvorgänge muss genau eingehalten werden.

- Die Wells niemals leer lassen.

- Die Streifen nicht unter grelles Licht stellen.

- Überprüfen, ob in den Wells keine Blasen vorhanden sind, bevor die OD gemessen wird.

8.1- BEDIENUNGSPROTOKOLL

Bei jeder Etappe genau die gleichen Inkubationszeiten für alle analysierten Wells einhalten.

Die Proben und der Probenleerwert müssen doppelt verteilt werden; ein doppelter Probenleerwert ist ausreichend für die gleichzeitige Analyse mehrerer Proben.

Direkt in die vorher beschichteten Wells geben (Reagenz 1):

		Well PGE1	Well PGE1 + ADP	Well Leerwert
EINFANGEN DES ANTIGENS	Reagenz:	2a: 40 µl	2b: 40 µl	5: 180 µl
	Vollblut:	40 µl	40 µl	—
	Vorsichtig den Inhalt der einzelnen Wells durch 8-10 Pipettierungen mischen			
	Die Wells abdecken und 10 Minuten bei RT inkubieren			
	Reagenz:	3: 100 µl	3: 100 µl	—
	Vorsichtig den Inhalt der einzelnen Wells durch 8-10 Pipettierungen mischen			
Die Wells abdecken und 30 Minuten bei RT inkubieren				
Alle Wells 3mal mit 300 µl verdünntem Reagenz 4 waschen, dann sofort hinzufügen:				
FIXIERUNG DES KONJUGATS	Verdünntes Reagenz 6:	200 µl	200 µl	200 µl
	Die Wells abdecken und 30 Minuten bei RT inkubieren			
Alle Wells 3mal mit 300 µl verdünntem Reagenz 4 waschen, dann sofort hinzufügen:				
FÄRBUNG	Reagenz 7:	200 µl	200 µl	200 µl
	5 Minuten bei RT inkubieren, dann hinzufügen:			
	Reagenz 8:	100 µl	100 µl	100 µl
	Den Inhalt aller Wells vorsichtig homogenisieren			
MESSUNG DER OD	Spätestens 4 Stunden nach Abstoppen der Reaktion die Extinktion bei 450 nm messen. (Die Platte muss bei RT gehalten werden.)			

8.2- BERECHNUNG DES PLÄTTCHENREAKTIVITÄTSINDEXES

Der Plättchenreaktivitätsindex (PRI) wird aus den optischen Dichten (OD_{450nm}) der getesteten Probe in Gegenwart von PGE1 allein [PGE1] oder von PGE1 und ADP [PGE1+ ADP] nach folgender Formel berechnet:

$$PRI (\%) = \frac{OD_{450nm}[PGE1] - OD_{450nm}[PGE1 + ADP]}{OD_{450nm}[PGE1] - OD_{450nm}[Leerwert]} \times 100$$

Bemerkung: Jedes Labor muss seine eigenen spezifischen Auswertungswerte gemäß dem beurteilten Antagonisten P2Y12 definieren.

Zur Messung der Wirksamkeit eines Antagonisten P2Y12 sollten folgende Empfehlungen beachtet werden:

- 1- Die Basalzone der PRI-Werte (Mittelwert \pm 2 Standardabweichungen) bei einer Gruppe von Patienten mit der betreffenden Pathologie, die nicht den zu beurteilenden Antagonisten P2Y12 erhalten, bestimmen. Der Richtwert des PRI bei nicht behandelten gesunden Spendern (n=32) liegt zwischen 89 % und 99 % (aus einer externen Studie stammende Werte).
- 2- Vor der Behandlung den PRI-Basalwert des getesteten Patienten (PRI_0) bestimmen und überprüfen, ob dieser Wert in der zuvor festgelegte Basalzone des PRI liegt. Wenn nicht, siehe Paragraph Einschränkungen (§10), gegebenenfalls den Test wiederholen.
- 3- Den PRI-Wert zu einem Zeitpunkt T (PRI_T) unter Berücksichtigung der pharmakodynamischen Eigenschaften des beurteilten Antagonisten P2Y12 bestimmen. Wenn der PRI_T -Wert immer noch in der Basalzone des PRI liegt, hat der Patient noch nicht auf das Arzneimittel angesprochen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ein niedriger PRI einem gut ansprechenden Patient entspricht, während ein hoher PRI entweder einen gesunden Probanden oder einen schlecht ansprechenden Patienten anzeigt. Je niedriger der PRI ist, desto mehr wird der Rezeptor P2Y12 gehemmt.

9- LEISTUNGEN

Reproduzierbarkeit:

Zwei Proben mit verschiedenen hohen PRI werden 8mal mit dem gleichen Assay getestet.

Probe	Probe 1	Probe 2
n	8	8
\bar{x} (PRI %)	43,69%	97,85%
SD	2,02	0,57
CV	4,6%	0,6%

Messbereich:

Der Messbereich der Methode liegt bei 0 bis 100% des PRI.

Korrelation mit dem Test PLT VASP/P2Y12 (BioCytex Best.-Nr. 7014, CE):

Der Test CY-QUANT VASP/P2Y12 ist stark mit dem zytometrischen Test PLT VASP/P2Y12: n= 96, r= 0,95, p< 0,001 korreliert.

Interferenzen:

- Zahl der Plättchen: bei Proben mit 50.000 bis 375.000 Plättchen/ μ l hat die Zahl der Plättchen keinen nachweisbaren Einfluss auf den Test CY-QUANT VASP/P2Y12.

- Zahl der Roten Blutkörperchen: bei unbehandelten Proben mit 1×10^6 bis $5,8 \times 10^6$ Roten Zellen/ μ l hat die Zahl der Roten Blutkörperchen keinen nachweisbaren Einfluss auf den Test CY-QUANT VASP/P2Y12.

- Aspirin und Arzneimittel gegen GpIIb/IIIa haben keinen nachweisbaren Einfluss auf den Test CY-QUANT VASP/P2Y12, da der Biomarker VASP für die Signalkaskade von P2Y12 spezifisch ist.

10- EINSCHRÄNKUNGEN

Der Assay CY-QUANT VASP/P2Y12 kann bei hämolysierten und/oder aktivierten Proben nicht verwendet werden.

11- HAFTUNG

Die Verwendung für die *In vitro*-Diagnostik ist nur unter strenger Befolgung der Arbeitsanleitung gültig. Jede Änderung oder Modifizierung kann das Testergebnis beeinflussen.








Reagenzien aus unterschiedlichen Testkits dürfen nicht ausgetauscht oder gemischt werden.

Wenn diese Empfehlungen nicht streng eingehalten werden, werden keine Beanstandungen akzeptiert und es wird kein Produktersatz gewährt.

12- REFERENZEN

- (a) Gurbel PA. et al. (2007) *Thromb Research* 120:311-321.
- (b) Angiollilo D. et al. (2007) *J Am Coll Cardiol* 49:1505-1516.
- (c) Barragan P. et al. (2010) *Thromb. Haemost* 104: 410-11.
- (d) Jakubowski J.A. et al. (2012) *Thromb. Haemost* 107: 388-395.
- (e) Abtan J. et al. (2013) *Thromb Haemost* 110(5):1055-64.

13- SYMBOLE

 REF	Bestellnummer		Verwendbar bis
 IVD	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Temperaturgrenzen	 LOT	Chargenbezeichnung
	Hersteller		



140, CH. DE L'ARMEE D'AFRIQUE
13010 MARSEILLE
FRANKREICH
TEL.: +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX: +33 (0) 4 91 47 24 71

Version Dezember 2017