

Wichtige Veränderungen werden durch gepunktete Linien am Seitenrand angezeigt.



1 EINLEITUNG

Der **PLT VASP/P2Y12**-Kit ist für das Monitoring von ADP-spezifischen Rezeptor (P2Y12)-Antagonisten bestimmt.

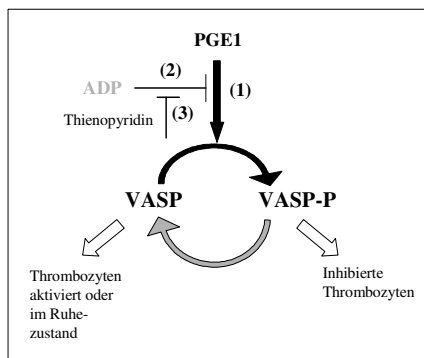
Das in den Thrombozyten befindliche VASP-Protein (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) ist in seinem Basalzustand nicht phosphoryliert.

Die Phosphorylierung von VASP wird über den cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-Weg geregelt. Während PGE1 (Prostaglandin E1) diesen Weg aktiviert (1), wird er durch ADP (Adenosindiphosphat), das auf die P2Y12-Rezeptoren (2) wirkt, gehemmt.

Unter Testbedingungen korreliert phosphoryliertes VASP mit der Inhibition des P2Y12-Rezeptors, während unphosphoryliertes VASP mit der aktiven Form des P2Y12-Rezeptors korreliert.

Über inter-individuelle Variationen und die Resistenz gegenüber Thienopyridinen gibt es zahlreiche Veröffentlichungen (3) (4). Die Wirkung der Thienopyridine (3) kann mit Hilfe des **PLT VASP/P2Y12**-Kits nachgewiesen werden, da in Anwesenheit von Thienopyridinen die PGE1 induzierte VASP-Phosphorylierung trotz gleichzeitiger Zugabe von ADP erhalten bleibt.

Der **PLT VASP/P2Y12**-Kit kann auch für die Evaluierung von *In-Vitro*-Wirkungen von P2Y12-Rezeptorantagonisten verwendet werden.



2 PRINZIP

Die Blutprobe wird parallel mit PGE1 alleine und mit PGE1 und ADP zusammen inkubiert. Nach Permeabilisierung der Zellen wird phosphoryliertes VASP mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (Klon 16C2 (6)) durch indirekte Immunofluoreszenz ohne Waschen markiert. Mittels zweifarbiger Durchflusszytometrie können die zwei getesteten Zustände verglichen werden und in jeder Probe kann die Kapazität des ADPs, die VASP Phosphorylierung zu inhibieren, bestimmt werden.

Der **Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI)** wird unter Verwendung der korrigierten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFic) berechnet, die für PGE1 alleine (PGE1) oder in Anwesenheit von PGE1 und ADP (PGE1+ADP) getestet wurden.

3 KITKOMPONENTEN

- **Reagenz 1:** 1 x 60 ml Verdünnungsmittel
- **Reagenz 2a:** 1 x Fläschchen PGE1
- **Reagenz 2b:** 1 x Fläschchen PGE1 + ADP
- **Reagenz 3:** 1 x Fläschchen (300 µl) Fixiermittel
- **Reagenz 4a:** 1 x Fläschchen (200 µl) monoklonale anti-VASP-P Maus-Antikörper + Permeabilisierungsmittel
- **Reagenz 4b:** 1 x Fläschchen (100 µl) isotypische Negativkontrolle (monoklonaler Maus-Antikörper) + Permeabilisierungsmittel
- **Reagenz 5:** 1 x Fläschchen (300 µl) Farbreagenz, polyklonaler, FITC-konjugierter Anti-IgG-Maus-Antikörper + PE-konjugiertes Thrombozyten- Gegenfärbereagenz (Anti-CD61-PE) + Permeabilisierungsmittel

4 NOTWENDIGE MATERIALIEN, DIE NICHT MITGELIEFERT WERDEN

- Vortex
- Timer
- Durchflusszytometer
- Verstellbare Pipetten mit Einwegspitzen (10 µl)
- Pipetten (1 und 2 ml)
- Hämolyseröhrchen für Durchflusszytometer
- Destilliertes Wasser, deionisiertes Wasser oder Wasser für Injektionsmittel

5 REKONSTITUTION UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

Hinweis: Das Testkit darf nicht eingefroren werden.

- **Reagenzien 1, 3, 4a, 4b und 5:** gebrauchsfertig
Stabilität nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8°C wenn keinerlei Kontamination vorliegt.
- **Reagenzien 2a und 2b:**
Fläschchen mit je 400 µl destilliertem Wasser rekonstituieren und 5 Sekunden auf einem Vortex homogenisieren.
Rekonstituierte Reagenzien sind 1 Monat bei 2-8 °C haltbar, wenn keinerlei Kontamination vorliegt.

6 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Einhaltung der allgemeinen Laborvorschriften.
- Entsorgung von Abfällen entsprechend der örtlich geltenden Vorschriften
- Blut ist als potenziell infektiös anzusehen.
- Reagenz 3 – Fixiermittel:
 - H351:** Kann vermutlich Krebs erzeugen
 - H319:** Verursacht schwere Augenreizung
 - H317:** Kann allergische Hautreaktionen verursachen
 - H333:** Kann beim Einatmen gesundheitsschädlich sein
 - P201:** Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
 - P280:** Schutzhandschuhe/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
 - P302 + P352:** BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen
- Reagenzien 4a – Anti-VASP-P, 4b – Isotypische Negativkontrolle, 5 – Farbreagenz:
 - H319:** Verursacht schwere Augenreizung
 - P280:** Schutzhandschuhe/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

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 (Schütteln, Thermoschock).
 - Antikoagulationsmittel: **Natriumzitrat 0,109 M oder 0,129 M** (9 Volumen Blut, 1 Volumen Zitrat verwenden).
- **Probenlagerung:**
 - Die Blutprobe muss innerhalb von **48 Stunden** nach der Entnahme bearbeitet werden.
 - Das Blutentnahmeröhrchen muss voll sein, bei Raumtemperatur aufbewahrt werden (18 – 25 °C) und darf vor dem Test nicht geöffnet werden.
 - Der Test wird mit Zitrat versetztem Gesamtblut durchgeführt.

8 VERFAHREN

Hinweis: Um gute Ergebnisse zu erzielen sollte beim Pipettieren von **kleinen Volumina (10 µl)** darauf geachtet werden, **dass die Reagenzien direkt auf den Röhrenboden pipettiert werden.**

Für die Durchführung des Tests müssen alle Reagenzien Raumtemperatur besitzen.

Wir empfehlen eine normale Probe als Kontrolle parallel zu jeder zu testenden Probenreihe mitlaufen zu lassen.

8.1 Vorbereitung der Röhrenchen und der Probe

Auf einem Gestell je Probe 3 Kunststoffröhrenchen anordnen, die mit T1, T2 und T3 gekennzeichnet sind:

- **10 µl Reagenz 2a** in das Röhrenchen T1 pipettieren.
- **10 µl Reagenz 2b** in die Röhrenchen T2 und T3 pipettieren.
- **10 µl Gesamtblut** in die Röhrenchen T1, T2 und T3 pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex **bei niedriger Geschwindigkeit**, homogenisieren.
- **10 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.

8.2 Fixierung

- **10 µl Reagenz 3** in die Röhrenchen T1, T2 und T3 pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex **bei niedriger Geschwindigkeit** homogenisieren.
- **5 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.

8.3 Permeabilisierung der Zellen und Immunomarkierung

- **10 µl Reagenz 4a** in die Röhrenchen T1 und T2 pipettieren.
- **10 µl Reagenz 4b** in das Röhrenchen T3 pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex **bei niedriger Geschwindigkeit** homogenisieren.
- **5 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.

8.4 Fluoreszenzmarkierung und Gegenfärbung der Thrombozyten

- **10 µl Reagenz 5** in die Röhrenchen T1, T2 und T3 pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex **bei niedriger Geschwindigkeit** homogenisieren.
- **5 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
- **2 ml Reagenz 1** in jedes der 3 Röhrenchen pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex **bei hoher Geschwindigkeit** homogenisieren.
- **20 Minuten** bei Raumtemperatur und lichtgeschützt inkubieren.

Die so vorbereiteten Proben können vor der Analyse mittels Durchflusszytometrie **2 Stunden bei Raumtemperatur und lichtgeschützt** 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.

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

Im Fenster "B" mindestens 5 000 Thrombozytenereignisse analysieren.

Für die Erstellung des Protokolls sind ein FS LOG x SS LOG-Zytopogramm und ein FL1 LOG x FL2 LOG-Zytopogramm erforderlich.

• Analyse des Röhrenchens T1:

- Auf dem Zytopogramm FS LOG x SS LOG die Thrombozyten-Zellwolke durch ein Analysefenster "A" isolieren. Die Leukozyten, die sich im Bereich des Pfeils befinden, liegen außerhalb des Fensters "A" (Abb. 1).
- Das FL1 LOG x FL2 LOG-Zytopogramm mit dem Analysefenster "A" eingrenzen.
- Die Spannung des Photomultiplikators FL2 so einstellen, dass die FL2-positive Wolke am Anfang der 3. Dekade positioniert wird.
- Die Spannung des Photomultiplikators FL1 so einstellen, dass der untere Teil der FL1-positiven und FL2-positiven Wolke am Anfang der 2. Dekade positioniert wird.
- **Eine Diskriminierungsschwelle im FL2 LOG setzen, um möglichst viele FL2-Ereignisse zu eliminieren (Grundrauschen des Geräts und Zelltrümmer).**
- Auf dem FL1 LOG x FL2 LOG Zytopogramm mit einem Analysefenster "B" (Abb. 2) die FL2-positiven Thrombozytenpopulation von den FL2-negativen Zellresten isolieren und die MFI auf der y-Achse ablesen.

Hinweis: Bei bestimmten Proben erscheint eine Zelltrümmerpopulation in Kometenform (durch den Pfeil symbolisiert), die sich links von der entsprechenden Wolke befindet. Das Fenster "B" während der Analyse von Röhrenchen T1 so setzen, dass die gesamte Thrombozytenwolke eingeschlossen und ein möglichst großer Teil der Zelltrümmer ausgeschlossen wird.

• Analyse der Röhrenchen T2 und T3:

- **Ohne die Position des Fensters "B" und die zuvor optimierten Einstellungen der PMTs SS, FS, FL1 und FL2 zu ändern**, die Röhrenchen T2 und T3 (Abb. 3 und 4) analysieren.
- Die MFI auf der y-Achse der Röhrenchen T2 und T3 ablesen (Abb. 3 und 4).

Nachfolgend die Abbildungen, die mit einem Beckman Coulter-Gerät, Modell EPICS XL, erhalten wurden:

Abb. 1: Positionierung des Analysefensters "A" für das Röhrenchen T1

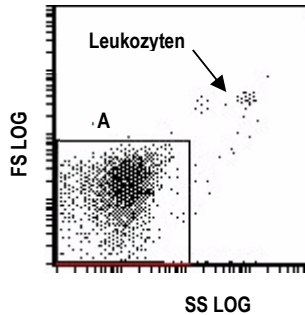


Abb. 2: Positionierung des Analysefensters "B" für das Röhrenchen T1 (MAb anti-VASP-P, Kondition PGE1)

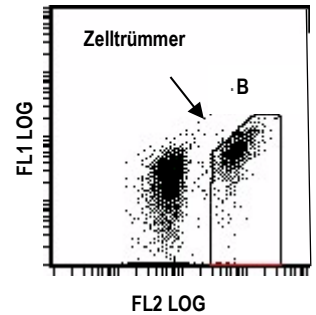


Abb. 3: Analyse des Röhrenchens T2 (MAb-anti VASP-P, Kondition PGE1+ADP)

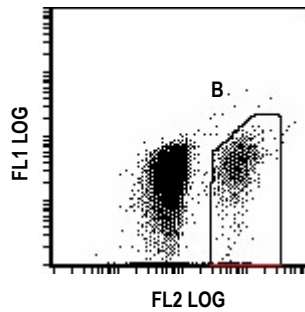
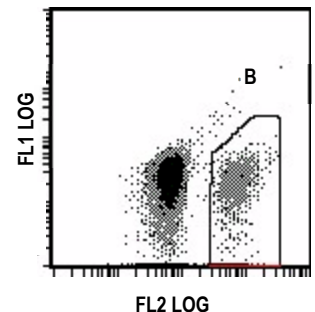


Abb. 4: Analyse des Röhrenchens T3 (Negativkontrolle, Kondition PGE1+ADP)



Nachfolgend die Abbildungen, die mit einem Becton Dickinson-Gerät, Modell FACSCalibur, erhalten wurden:

Abb. 1: Positionierung des Analysefensters "A" für das Röhrenchen T1

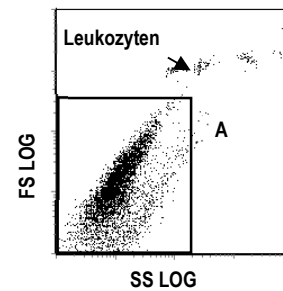


Abb. 2: Positionierung des Analysefensters "B" für das Röhrenchen T1 (MAb-anti VASP-P, Kondition PGE1)

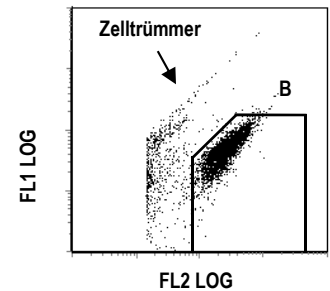


Abb. 3: Analyse des Röhrenchens T2 (MAb anti-VASP-P, Kondition PGE1+ADP)

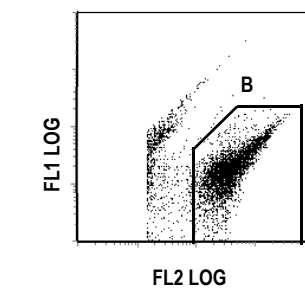
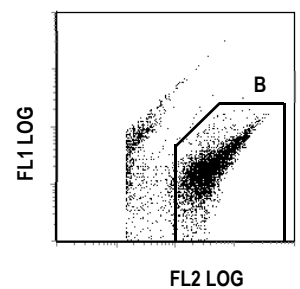


Abb. 4: Analyse des Röhrenchens T3 (Negativkontrolle, Kondition PGE1+ADP)



Hinweis: Durch die Verwendung der isotypischen Negativkontrolle ist keinerlei Kompensierungseinstellung erforderlich.

Trotzdem werden die Testergebnisse durch Kompensierungseinstellungen nicht beeinträchtigt.

8.6 Analyse der Ergebnisse

Im Anschluss an die durchflusszytometrische Analyse ist der Wert der korrigierten MFI (MFI_c) für die Röhrchen T1 und T2 zu bestimmen.

Zur Erstellung des MFI_c wird der MFI-Wert, der für die Negativkontrolle bestimmt wurde (Röhrchen T3), von den MFI-Werten, die für MAb anti-VASP-P ermittelt wurden, abgezogen (Röhrchen T1 oder T2).

$$\text{MFI}_c (\text{PGE}_1) = \text{MFI} (\text{T}_1) - \text{MFI} (\text{T}_3)$$

$$\text{MFI}_c (\text{PGE}_1 + \text{ADP}) = \text{MFI} (\text{T}_2) - \text{MFI} (\text{T}_3)$$

9 TESTAUSWERTUNG

Der **Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI)** wird unter Verwendung der korrigierten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI_c), die für PGE1 alleine (PGE1) und in Anwesenheit von PGE1 und ADP (PGE1+ADP) getestet wurden, nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI)} = \frac{[\text{MFI}_{\text{PGE}_1} - \text{MFI}_{\text{(PGE}_1 + \text{ADP})}] / \text{MFI}_{\text{PGE}_1} \times 100$$

Jedes Labor muss seine eigenen Auswertungswerte ermitteln, die für den zu bestimmenden P2Y12-Antagonisten spezifisch sind.

Behandlung mit Clopidogrel:

Mit dem **PLT VASP/P2Y12** ⁽¹⁾-Kit wurden inter-individuelle Variationen im Ansprechen auf eine Behandlung mit Clopidogrel nachgewiesen:

Die PRI der Patienten (n = 33), die an einer ischämischen Herz-Gefäß-Krankheit litten und mehr als eine Woche lang mit Clopidogrel behandelt wurden, variierten von 6,6 bis 85,8 %.



Um die Effizienz eines P2Y12-Antagonisten wie etwa Clopidogrel zu messen, sind die folgenden Hinweise zu berücksichtigen:

1- Der Basalbereich der PRI-Werte (**ausgedrückt als Mittel +/- 2 Standardabweichungen**) ist für eine Patientengruppe mit entsprechender Krankheit, die den zu untersuchenden P2Y12-Antagonisten nicht erhält, zu bestimmen.

Zur Information sei hier angemerkt, dass laut Veröffentlichung von Aleil B. *et al.* ⁽¹⁾ der PRI der Patienten (n = 34), die an einer ischämischen Herz-Gefäß-Krankheit litten und nicht mit Clopidogrel behandelt wurden, 79,0 +/- 4,1 % betrug (ausgedrückt als Mittel +/- Standardabweichung).

2- Vor der Behandlung ist der PRI-Basalwert des zu testenden Patienten (PRI₀) zu bestimmen und zu prüfen, ob dieser Wert in den zuvor etablierten PRI-Basalbereich fällt. Ist dies nicht der Fall, ist im Abschnitt Anwendungsgrenzen (§11) nachzulesen und der Test gegebenenfalls zu wiederholen.

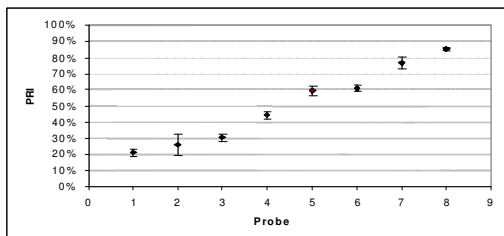
3- Bestimmung des PRI-Werts zu einem Zeitpunkt T (PRI_T) unter Berücksichtigung der pharmakodynamischen Eigenschaften des zu bestimmenden P2Y12-Antagonisten. Wenn der PRI_T-Wert immer noch innerhalb des PRI-Basalbereichs liegt, hat das Arzneimittel beim Patienten keine Wirkung gezeigt.

10 LEISTUNGEN

Der **PLT VASP/P2Y12**-Test wurde auf den Becton Dickinson-Geräten, Modell FACSCalibur, und Beckman Coulter-Geräten, Modelle XL und XL MCL, validiert.

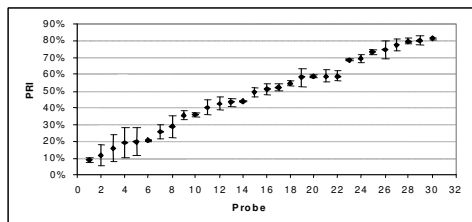
Wiederholbarkeit:

Proben (n = 8), die unterschiedlichen Antwortgraden (PRI) entsprechen, wurden fünfmal mit demselben Kit getestet. Die Variationen sind unten dargestellt (Mittel +/- Standardabweichung):



Reproduzierbarkeit mit verschiedenen Chargen:

Proben (n = 30), die unterschiedlichen Antwortgraden (PRI) entsprechen, wurden mit 3 verschiedenen Kit-Chargen getestet. Die Variationen sind unten in der Grafik dargestellt (Mittel +/- Standardabweichung):



Messbereich:

Der Messbereich für die Methode erstreckt sich von 0 bis 100 % PRI.

Interferenzen:

Aspirin:

Laut Veröffentlichung von Aleil B. *et al.* ⁽¹⁾ führt Aspirin zu keiner signifikanten Interferenz beim **PLT VASP/P2Y12**-Test (n = 67): p = 0,328.

Thrombozyten-Zählung:

Bei nicht behandelten Proben, die 50 000 bis 300 000 Thrombozyten/µl Blut enthalten, hat die Thrombozytenanzahl beim **PLT VASP/P2Y12**-Test zu keiner bedeutenden Interferenz geführt.

Abciximab:

Laut Veröffentlichung von Van Werkum J. *et al.* ⁽²⁾ führt Abciximab zu keiner signifikanten Interferenz beim **PLT VASP/P2Y12**-Test (n=11): p=0.89.

Korrelation mit der Aggregation:

Wie in der Veröffentlichung von Aleil B. *et al.* ⁽¹⁾ beschrieben, besteht beim **PLT VASP/P2Y12**-Test eine enge Korrelation mit der Inhibierung der ADP-induzierten Plättchenaggregation aufgrund der spezifischen *In-Vitro*-P2Y12-Inhibition: r = 0,72; p < 0,0001.

11 ANWENDUNGSGRENZEN

- Der **PLT VASP/P2Y12**-Kit kann nicht für hämolysierte Blutproben verwendet werden.

- Der **PLT VASP/P2Y12**-Kit sollte nicht für Proben verwendet werden, bei denen die gezählten roten Blutkörperchen die Untergrenze der normalen Werte unterschreiten. In diesem Fall wird empfohlen, den Test mit neuen Proben durchzuführen, die frühestens 24 Stunden später entnommen werden.

- Wenn die durchflusszytometrische Analyse unmittelbar nach Zugabe von 2 ml Reagenz 1 am Ende des Protokolls durchgeführt wird, kann in manchen Proben eventuell eine unvollständige Auflösung der roten Blutkörperchen beobachtet werden. Dies wird durch ein Überlappen der Thrombozytenwolke und der Wolke der roten Blutkörperchen sichtbar.

Für eine vollständige Auflösung der roten Blutkörperchen ist die Probe in diesem Fall für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren, bevor die Röhrchen mit dem Vortex durchmischt werden. Anschließend ist die durchflusszytometrische Messung zu wiederholen.

12 HAFTUNG

Für die ordnungsgemäße Verwendung im Rahmen der *In-vitro*-Diagnostik sind die Anweisungen in der Anleitung strikt zu befolgen. Jede Modifizierung des Testprotokolls kann die Ergebnisse des Tests beeinflussen. Verwenden Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen. In diesem Fall sind Reklamationen bzw. der Austausch des Produktes ausgeschlossen.

13 LITERATURHINWEISE

- (1) ALEIL B. *et al.* (2005) *J Thromb Haemost* 3: 85-92.
- (2) VAN WERKUM J. *et al.* (2007) *J Thromb Haemost* 5: 881-883.
- (3) BONELLO L. *et al.* (2009) *Am J Cardiol.* 103(1):5-10.
- (4) BARRAGAN P. *et al.* (2003) *Cathet Cardiovasc Intervent* 59: 295-302.
- (5) GURBEL P.A. *et al.* (2003) *Circulation* 107: 2908-2913.
- (6) MULLER I. *et al.* (2003) *Thromb Haemost* 89: 783-787.
- (7) GEIGER J. *et al.* (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2007-2011.
- (8) SCHWARZ U.R. *et al.* (1999) *Thromb Haemost* 82: 1145-1152.

14 SYMBOLE

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

BIOCYTEX
140 ch. DE L'ARMEE D'AFRIQUE
13010 MARSEILLE
FRANCE

TEL. +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX +33 (0) 4 91 47 24 71

Version März 2018