

## CY-QUANT VASP/P2Y12

Para la medición de los antagonistas específicos del receptor ADP plaquetario

### Contenido del kit:

- 1 microplaca de Reactivo 1 (96 pocillos recubiertos anti-VASP)
- 3 viales de Reactivo 2a (PGE1)
- 3 viales de Reactivo 2b (PGE1 + ADP)
- 1 vial de Reactivo 3 (Tampón de lisis)
- 1 vial de Reactivo 4 (Solución de lavado)
- 1 vial de Reactivo 5 (Tampón de dilución)
- 1 vial de Reactivo 6 (Anti-VASP-P peroxidasa)
- 1 vial de Reactivo 7 (TMB)
- 1 vial de Reactivo 8 (Solución de parada)
- 1 herramienta para extraer los pocillos

Para diagnóstico in vitro

Ref. 7502



### 1 - INTRODUCCIÓN

**CY-QUANT VASP/P2Y12** es un procedimiento de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar la VASP fosfoserina 239 (VASP-P) en las plaquetas de la sangre humana completa fresca.

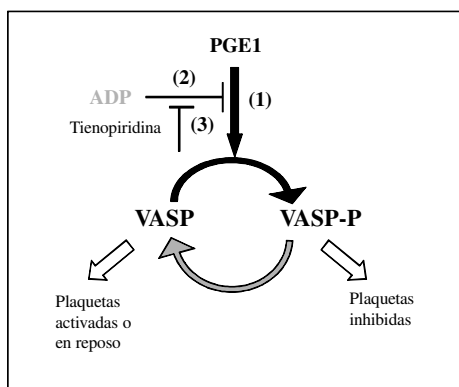
El kit **CY-QUANT VASP/P2Y12** está indicado para la medición de los antagonistas específicos del receptor ADP plaquetario (P2Y12).

La fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) es una proteína plaquetaria intracelular que no está fosforilada en condiciones basales.

La prostaglandina E1 (PGE1) induce la fosforilación de VASP (1), mientras que la unión de la adenosina difosfato (ADP) a los receptores P2Y12 (2) conduce a la defosforilación de la VASP. En condiciones de ensayo, en la adición concomitante de ADP y PGE1 predomina el efecto de la ADP, lo que conduce a la defosforilación de la VASP, salvo que el receptor P2Y12 sea bloqueado de manera eficiente por los fármacos antiplaquetarios dirigidos a este receptor (como las tienopiridinas). En estas condiciones, el nivel de fosforilación de la VASP refleja el nivel de inhibición del receptor P2Y12.

La variabilidad interindividual y la resistencia a los fármacos antiplaquetarios han sido ampliamente descritas <sup>(a,b)</sup>. Se puede demostrar el efecto de las tienopiridinas (3) mediante **CY-QUANT VASP/P2Y12** por la persistencia de la fosforilación de la VASP inducida por PGE1, a pesar de la adición simultánea de ADP.

**CY-QUANT VASP/P2Y12** también se puede utilizar para evaluar los efectos *in vitro* de los antagonistas del receptor P2Y12.



### 2 - FUNCIONAMIENTO DE LA PRUEBA

Después de un primer paso de activación paralela de la muestra de sangre completa con PGE1 y PGE1+ADP (Reactivos 2a y 2b), se practica la lisis de las plaquetas de la muestra (Reactivo 3), lo que permite que la VASP liberada sea capturada por un anticuerpo VASP antihumano revestido en la placa de microtitulación (Reactivo 1). A continuación, un anticuerpo VASP-P antihumano combinado con peroxidasa (Reactivo 6) se une a la fosfoserina 239 determinante antigénico de la VASP. Entonces, la enzima peroxidasa unida queda revelada por su actividad en el sustrato TMB (Reactivo 7) durante un tiempo predeterminado. Después de detener la reacción (Reactivo 8), la absorción a 450 nm está directamente relacionada con la concentración de la VASP-P contenida en la muestra.

El índice de reactividad plaquetaria (PRI) se calcula utilizando la densidad óptica (DO<sub>450 nm</sub>) en presencia solamente de PGE1 [PGE1] o de PGE1 y ADP simultáneamente [PGE1+ ADP].

### 3 - REACTIVOS

- **Reactivo 1:** Microplaca de 96 pocillos formada por 12 tiras separables de 8 pocillos revestidos con el AcM VASP antihumano de ratón, en una bolsa con cierre hermético.
- **Reactivo 2a:** vial, liofilizado de PGE1.
- **Reactivo 2b:** vial, liofilizado de PGE1 + ADP.
- **Reactivo 3:** vial, 15 ml, tampón de lisis.
- **Reactivo 4:** vial, 50 ml, solución de lavado concentrada 20x.
- **Reactivo 5:** vial, 50 ml, tampón de dilución.
- **Reactivo 6:** vial, 1,6 ml, AcM específico VASP antihumano de ratón concentrado 20x en combinación con peroxidasa.
- **Reactivo 7:** vial, 25 ml, TMB (tetrametil benzidina).
- **Reactivo 8:** vial, 15 ml, solución de parada.

### 4 - MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Agua desionizada o destilada, equilibrada a temperatura ambiente y preferiblemente estéril.
- Temporizador.
- Pipetas multicanal, pipetas con puntas desechables.
- Lector de placas de ELISA calibrado a 450 nm.
- Agitador vortical.
- Papel absorbente.

### 5 - ADVERTENCIA

- Se deberán seguir las prácticas de laboratorio convencionales.
- Se deberá cumplir con la normativa establecida para la eliminación de residuos.
- La sangre debe ser considerada como potencialmente infecciosa.
- Reactivo 3 – Tampón de lisis:
  - H319:** Provoca irritación ocular grave
  - H333:** Puede ser nocivo en caso de inhalación
  - EUH208:** Contiene 5-chloro-2-methyl-4-isothiazol-3-one/2-methyl-4-isothiazol-3-one (3:1). Puede provocar una reacción alérgica
  - P280:** Llevar guantes / prendas / gafas / máscara de protección
  - P305 + P351 + P338:** EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando
  - P304 + P340:** EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración
- Reactivo 5 – Tampón de dilución:
  - H317:** Puede provocar una reacción alérgica en la piel
  - P280:** Llevar guantes / prendas / gafas / máscara de protección
  - P302 + P352:** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes

- Reactivo 8 – Solución de parada:

**H314:** Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves

**P280:** Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección

**P301 + P330 + P331:** EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagarse la boca. NO provocar el vómito

**P303 + P361 + P353:** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse

**P305 + P351 + P338:** EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando

**P310:** Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico

## 6 - PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

- Si los kits se conservan a 2-8° C sin abrir, su contenido se mantiene estable hasta la fecha de caducidad impresa.

- Antes de su uso, todos los reactivos deben ser equilibrados a temperatura ambiente (TA, 18-25° C) durante al menos 30 minutos.

### ● Reactivo 1

Listo para su uso. Después del primer uso, se deberán guardar inmediatamente las tiras no utilizadas y los pocillos en la bolsa con cierre hermético, con desecante, y almacenar a 2-8° C.

Estabilidad tras la apertura: 2 meses a 2-8° C, en ausencia de contaminación.

### ● Reactivos 2a y 2b

Reconstituir cada vial con **900 µL** de agua desionizada o destilada y homogeneizar el contenido mediante un agitador vorticial durante 5 segundos.

Estabilidad tras la reconstitución: 1 mes a 2-8° C, en ausencia de contaminación.

### ● Reactivos 3, 5 y 8

Listo para su uso. Estabilidad tras la apertura: 2 meses a 2-8° C, en ausencia de contaminación.

### ● Reactivo 4

Estabilidad tras la apertura: 2 meses a 2-8° C, en ausencia de contaminación.

Antes de su uso, diluir el reactivo en proporción **1:20** con agua desionizada o destilada.

Para un pocillo, diluir 100 µL de **Reactivo 4** con 1 900 µL de agua desionizada o destilada.

Estabilidad tras la dilución: 15 días a 2-8° C, en ausencia de contaminación.

**Nota:** La presencia de cristales no afecta a la calidad del reactivo. Si fuese necesario, calentar a 37° C hasta que se disuelvan los cristales. A continuación, se deberá homogeneizar y equilibrar a TA.

### ● Reactivo 6

Estabilidad tras la apertura: 2 meses a 2-8° C, en ausencia de contaminación.

Antes de su uso, diluir este reactivo en proporción **1:20** con **Reactivo 5**.

Para un pocillo, diluir 15 µL de **Reactivo 6** con 285 µL de **Reactivo 5**.

Estabilidad tras la dilución: 1 hora a TA.

**Nota:** Como el vial está totalmente lleno, se deberá cerrar la pipeta con cuidado para evitar que se derrame.

### ● Reactivo 7

Listo para su uso. Estabilidad tras la apertura: 2 meses a 2-8° C, en ausencia de contaminación.

**Nota:** Evitar la exposición a la luz, el calor y la contaminación de iones metálicos o peroxidasa.

## 7 - RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- Introducir sangre venosa completa en un tubo con **citratro trisódico al 0,109 M**, siguiendo las indicaciones del fabricante.

- Mantener la integridad plaquetaria. Evitar la activación de las plaquetas durante el procedimiento de recogida (sacudidas, golpes de calor).

- El tubo de recogida de sangre deberá estar completamente lleno, almacenado a temperatura ambiente y sin abrir antes de la prueba.

- Se deberán analizar las muestras en el plazo de **24 horas** desde su recogida.

## 8 - PROCEDIMIENTO

Se recomienda realizar una prueba en paralelo de una muestra normal de cada serie, para que sirva de control.

### Notas:

- Las fases de lavado se pueden realizar con un sistema automatizado para lavado de placas o bien de forma manual con una pipeta multicanal.

- En el lavado manual, primero se deberán vaciar todos los pocillos pasando el líquido a un recipiente apropiado y secando la placa con un papel absorbente limpio. A continuación, se llena cada pocillo con 300 µL del Reactivo 4 diluido, se extrae la solución de lavado y se seca la placa con un papel absorbente limpio.

- Se deberán respetar escrupulosamente todos los pasos de lavado.

- No dejar que los pocillos se sequen en ningún momento.

- No exponer las tiras a una luz potente.

- Antes de medir la DO, comprobar que no haya burbujas en los pocillos.

### 8.1 - PROCEDIMIENTO OPERATIVO

En cada paso, se deberá dejar un periodo de incubación idéntico para cada pocillo.

Distribuir las muestras a analizar y el blanco de reactivos por duplicado; un blanco duplicado es suficiente para una serie de muestras.

Pipetear directamente en los pocillos previamente recubiertos (Reactivo 1):

		Pocillo PGE1	Pocillo PGE1 + ADP	Pocillo Blanco
CAPTURA DE ANTIGENO	Reactivo:	<b>2a:</b> 40 µL	<b>2b:</b> 40 µL	<b>5:</b> 180 µL
	Muestra de sangre completa:	40 µL	40 µL	—
	Mezclar bien el contenido de cada pocillo pipeteando arriba y abajo 8-10 veces			—
	Cubrir los pocillos e incubar durante <b>10 minutos</b> a TA			—
	Reactivo:	<b>3:</b> 100 µL	<b>3:</b> 100 µL	—
	Mezclar bien el contenido de cada pocillo pipeteando arriba y abajo 8-10 veces			—
	Cubrir los pocillos e incubar durante <b>30 minutos</b> a TA			—
Lavar todos los pocillos 3 veces con 300 µL de Reactivo 4 diluido, y añadir inmediatamente:				
CONJUGADO INMOVILIZADO	Reactivo 6 diluido:	200 µL	200 µL	200 µL
	Cubrir los pocillos e incubar durante <b>30 minutos</b> a TA			
Lavar todos los pocillos 3 veces con 300 µL de Reactivo 4 diluido, y añadir inmediatamente:				
DESARROLLO DE COLOR	Reactivo 7:	200 µL	200 µL	200 µL
	Incubar <b>5 minutos</b> a TA y añadir:			
	Reactivo 8:	100 µL	100 µL	100 µL
Homogeneizar completamente el contenido de cada pocillo				
MEDICIÓN DE LA DÓ	Medir la absorción a <b>450 nm</b> hasta <b>4 horas</b> a TA después de detener la reacción			

## 8.2 - CÁLCULO DEL ÍNDICE DE REACTIVIDAD PLAQUETARIA (PRI)

El índice de reactividad plaquetaria (PRI) se calcula utilizando la densidad óptica ( $DO_{450nm}$ ) en presencia solamente de PGE1 [PGE1] o de PGE1 y ADP simultáneamente [PGE1+ ADP], de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

**Nota:** Cada laboratorio deberá establecer sus propios valores de interpretación, dependiendo del antagonista del P2Y12 a evaluar.

Con el fin de medir la eficacia de un antagonista del P2Y12, se deberán seguir las recomendaciones siguientes:

- 1- Determinar el rango basal del PRI (media  $\pm$  2 desviaciones estándar) en un grupo de pacientes con la enfermedad correspondiente y que no hayan recibido el antagonista del P2Y12 a evaluar. Como orientación, el PRI de donantes sanos no tratados (n=32) oscila entre el 89% y el 99% (datos de un estudio externo).
- 2- Determinar el valor basal del PRI del paciente antes del tratamiento (PRI<sub>0</sub>) y confirmar que este valor esté incluido en el rango basal de PRI preestablecido. De lo contrario, consultar la sección de Limitaciones (apartado 10) y repetir la prueba, si fuese necesario.
- 3- Determinar el valor del PRI en un punto de tiempo T (PRI<sub>T</sub>) de acuerdo con las propiedades farmacodinámicas de los antagonistas del P2Y12 evaluados. Un valor PRI<sub>T</sub> incluido en el rango basal del PRI, significa que el paciente no ha respondido al fármaco.

En resumen, un PRI bajo corresponde a un paciente con buena respuesta, mientras que un PRI alto corresponde a un sujeto sano o a un paciente con mala respuesta. Cuanto menor sea el PRI, mayor será la inhibición del receptor P2Y12.

## 9 - RESULTADOS

### Repetibilidad:

Dos muestras que presentan distintos niveles de PRI han sido testadas 8 veces con el mismo kit.

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

### Rango de funcionamiento:

El rango de funcionamiento de este método es desde 0 hasta 100% del PRI.

### Correlación con el PLT VASP/P2Y12 (BioCytex ref. 7014, CE):

La prueba CY-QUANT VASP/P2Y12 está estrechamente correlacionada con la prueba de citometría de flujo PLT VASP/P2Y12: n = 96; r = 0,95; p < 0,001.

### Interferencias:

- Recuento plaquetario: en muestras desde 50.000 hasta 375.000 plaquetas/ $\mu$ L, el recuento de plaquetas no interfiere significativamente en el ensayo CY-QUANT VASP/P2Y12.

- Recuento de hemáties: en muestras no tratadas desde  $1 \times 10^6$  hasta  $5,8 \times 10^6$  hemáties/ $\mu$ L, el recuento de hemáties no interfiere significativamente en el ensayo CY-QUANT VASP/P2Y12.

- La aspirina y los fármacos contra GP IIb / IIIa no interfieren significativamente en el ensayo CY-QUANT VASP/P2Y12, ya que el biomarcador VASP es específico de la vía de señalización del P2Y12.

## 10 - LIMITACIONES

El kit CY-QUANT VASP/P2Y12 no se puede utilizar para muestras de sangre activadas y/o hemolizadas.

## 11 - RESPONSABILIDAD

El uso diagnóstico *in vitro* solo es válido cuando se siguen estrictamente las normas de aplicación del paquete. Cualquier modificación del protocolo podría influir en el resultado de la prueba.








No mezclar ni cambiar nunca los viales originales de distintos kits.

En caso de no respetar estrictamente estas recomendaciones, no se aceptará la sustitución del producto.

## 12 - BIBLIOGRAFÍA

- (a) Gurbel PA. *et al.* (2007) *Thromb Research* 120:311-321.
- (b) Angiolillo D. *et al.* (2007) *J Am Coll Cardiol* 49:1505-1516.
- (c) Barragan P. *et al.* (2010) *Thromb. Haemost* 104(2): 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 - SÍMBOLOS

 REF	Referencia del catálogo	 Utilizar hasta
 IVD	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	 Contenido suficiente para "n" tests
 Límites de temperatura		 LOT Código del lote
 Fabricante		



140, CH. DE L'ARMÉE D'AFRIQUE  
13010 MARSEILLE  
FRANCIA

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

Versión Diciembre 2017