

CY-QUANT VASP/P2Y12

Pour le dosage des antagonistes spécifiques
du récepteur plaquettaire à l'ADP

Contenu du kit :

- 1 microplaque de Réactif 1 (96 puits coatés anti-VASP)
- 3 flacons de Réactif 2a (PGE1)
- 3 flacons de Réactif 2b (PGE1 + ADP)
- 1 flacon de Réactif 3 (Tampon de lyse)
- 1 flacon de Réactif 4 (Solution de lavage)
- 1 flacon de Réactif 5 (Tampon de dilution)
- 1 flacon de Réactif 6 (Anti-VASP-P-péroxydase)
- 1 flacon de Réactif 7 (TMB)
- 1 flacon de Réactif 8 (Solution stop)
- 1 outil pour extraction des puits de leur barrette support

A Usage Diagnostic In Vitro

Réf. 7502



1- INTRODUCTION

CY-QUANT VASP/P2Y12 est une trousse de dosage par immuno-absorption enzymatique (ELISA) de la molécule VASP phosphorylée en sérine 239 (VASP-P) dans les plaquettes de sang total humain frais.

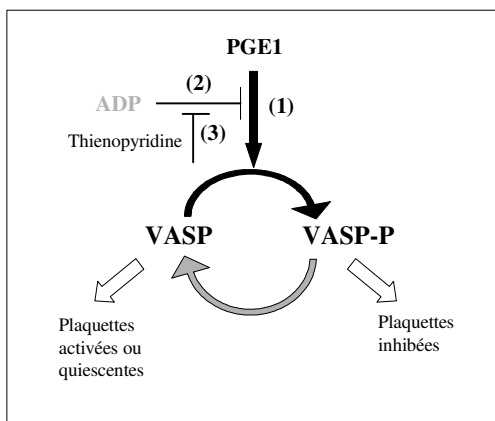
CY-QUANT VASP/P2Y12 est dédiée au dosage des antagonistes spécifiques du récepteur plaquettaire à l'ADP, P2Y12.

La protéine intra-plaquettaire VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) est non phosphorylée à l'état basal.

La prostaglandine E1 (PGE1) induit la phosphorylation de VASP (1) tandis que la fixation de l'adénosine diphosphate (ADP) sur les récepteurs P2Y12 (2) entraîne la déphosphorylation de VASP. Dans les conditions du test et lors de l'ajout simultané de PGE1 et d'ADP, l'effet de l'ADP prévaut et induit la déphosphorylation de VASP, à moins que le récepteur P2Y12 soit efficacement bloqué par des drogues anti-plaquettaires ciblant ce récepteur (comme les thiénoxyridines). Le niveau de phosphorylation de VASP dans cette condition reflète donc le niveau d'inhibition du récepteur P2Y12.

Des variations inter-individuelles et phénomènes de résistance aux drogues antiplaquettaires ont été largement documentées (a,b). L'effet des thiénoxyridines (3) peut être mis en évidence avec la trousse **CY-QUANT VASP/P2Y12** par la persistance de la phosphorylation de VASP induite par la PGE1, malgré l'ajout simultané d'ADP.

La trousse **CY-QUANT VASP/P2Y12** peut aussi être utilisée pour évaluer les effets *in vitro* des antagonistes du récepteur P2Y12.



2- PRINCIPE DU TEST

Après une première étape d'activation de l'échantillon de sang total en parallèle par PGE1 et PGE1+ADP (Réactifs 2a et 2b), les plaquettes sont lysées (Réactif 3) et le VASP ainsi libéré se retrouve capturé par un anticorps anti-VASP humain coaté dans la microplaque (Réactif 1). Puis un anticorps anti-VASP-P humain couplé à la peroxydase (Réactif 6) se fixe sur un déterminant antigénique du VASP, la Ser 239 phosphorylée. Le taux de peroxydase liée est alors mesuré par son activité sur le substrat TMB (Réactif 7). Après arrêt de la réaction (Réactif 8), l'intensité du signal (absorbance à 450 nm) est directement reliée à la concentration de VASP-P présente dans l'échantillon.

Un **index de réactivité plaquettaire (PRI)** est calculé à partir des densités optiques (DO_{450nm}) de l'échantillon testé en présence de PGE1 seule [PGE1] ou de PGE1 et d'ADP [PGE1+ADP].

3- REACTIFS

- **Réactif 1 :** microplaque 96 puits composée de 12 barrettes sécables de 8 puits individuels recouverts d'AcM de souris anti-VASP humain, dans un emballage refermable.
- **Réactif 2a :** flacon de PGE1 lyophilisée.
- **Réactif 2b :** flacon de PGE1 + ADP lyophilisés.
- **Réactif 3 :** flacon de 15 mL de tampon de lyse.
- **Réactif 4 :** flacon de 50 mL de solution de lavage, 20 fois concentrée.
- **Réactif 5 :** flacon de 50 mL de tampon de dilution.
- **Réactif 6 :** flacon de 1,6 mL d'AcM de souris anti-VASP-P humain couplé à la peroxydase, 20 fois concentré.
- **Réactif 7 :** flacon de 25 mL de TMB (tétraméthylbenzidine).
- **Réactif 8 :** flacon de 15 mL de solution stop.

4- MATERIEL AUXILIAIRE NECESSAIRE NON FOURNI

- Eau déionisée ou distillée équilibrée à température ambiante, stérile de préférence.
- Chronomètre.
- Pipettes multicanaux, pipettes à embouts jetables.
- Lecteur de plaques équipé d'un filtre à 450 nm.
- Agitateur type Vortex.
- Papier absorbant.

5- PRECAUTIONS

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
- Se conformer à la réglementation locale en vigueur pour l'élimination des déchets.
- Considérer le sang comme potentiellement infectieux.
- Réactif 3 – Tampon de lyse :
 - H319 :** Provoque une sévère irritation des yeux
 - H333 :** Peut être nocif par inhalation
- EUH208 :** Contient mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazol-3-one/2-méthyl-4-isothiazol-3-one (3:1). Peut provoquer une allergie cutanée
- P280 :** Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux / du visage
- P305 + P351 + P338 :** EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer
- P304 + P340 :** EN CAS D'INHALATION : transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer
- Réactif 5 – Tampon de dilution :
 - H317 :** Peut provoquer une allergie cutanée
 - P280 :** Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux / du visage
 - P302 + P352 :** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon

- Réactif 8 – Solution stop :

H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage

P301 + P330 + P331 : EN CAS D'INGESTION: rincer la bouche. NE PAS faire vomir

P303 + P361 + P353 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher

P305 + P351 + P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer

P310 : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin

6- RECONSTITUTION ET CONSERVATION DES REACTIFS

Conservés à 2-8°C dans leur conditionnement d'origine, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée.

Avant utilisation, tous les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (TA, 18-25°C) pendant au moins 30 minutes.

● Réactif 1

Prêt à l'emploi. Après la première utilisation, replacer immédiatement les barrettes et puits non utilisés dans l'emballage refermable contenant le sachet déshydratant et stocker à 2-8 °C.

Stabilité après ouverture : 2 mois à 2-8°C, en dehors de toute contamination.

● Réactifs 2a et 2b

Reconstituer chaque flacon avec **900 µL** d'eau déionisée ou distillée et homogénéiser le contenu à l'aide d'un agitateur de type vortex pendant 5 secondes.

Stabilité après reconstitution : 1 mois à 2-8°C, en dehors de toute contamination.

● Réactifs 3, 5 et 8

Prêts à l'emploi. Stabilité après ouverture : 2 mois à 2-8°C, en dehors de toute contamination.

● Réactif 4

Stabilité après ouverture : 2 mois à 2-8°C, en dehors de toute contamination. Avant utilisation, diluer au **1/20** avec de l'eau déionisée ou distillée.

Pour un puits, diluer 100 µL de **Réactif 4** avec 1 900 µL d'eau déionisée ou distillée.

Stabilité après dilution : 15 jours à 2-8°C, en dehors de toute contamination.

Remarque : La présence de cristaux n'altère en rien la qualité du réactif. Si nécessaire, incuber à 37°C jusqu'à totale dissolution des cristaux puis homogénéiser et équilibrer à TA.

● Réactif 6

Stabilité après ouverture : 2 mois à 2-8°C, en dehors de toute contamination.

Avant utilisation, diluer le réactif au **1/20** avec le **Réactif 5**.

Pour un puits, diluer 15 µL de **Réactif 6** avec 285 µL de **Réactif 5**.

Stabilité après dilution : 1 heure à TA.

Remarque : Le flacon étant rempli à capacité, pipeter précautionneusement pour éviter que le réactif ne déborde.

● Réactif 7

Prêt à l'emploi. Stabilité après ouverture : 2 mois à 2-8°C, en dehors de toute contamination.

Remarque : Éviter l'exposition à la lumière et à la chaleur, ainsi que la contamination avec des ions métalliques ou de la peroxydase.

7- RECUEIL ET CONSERVATION DE L'ECHANTILLON

- Collecter du sang total veineux dans un tube de prélèvement **citrate de sodium 0,109 M**, conformément aux recommandations du fabricant.

- Maintenir l'intégrité des plaquettes en évitant tout risque d'activation durant le prélèvement (agitation, choc thermique).

- Le tube doit être rempli à capacité, conservé à TA et ne doit pas être ouvert avant le test.

- L'échantillon doit être traité dans les **24 heures** qui suivent le prélèvement.

8- PROCEDURE

Nous recommandons de tester un échantillon normal comme contrôle en parallèle de chaque série d'échantillons.

Remarques :

- Les lavages peuvent être réalisés indifféremment à la main (pipette multicanaux) ou avec un laveur de plaque automatisé.

- À chaque lavage manuel, vider les puits par retournement de la plaque, tamponner la plaque sur du papier absorbant propre, remplir les puits avec 300 µL de Réactif 4 dilué puis les vider entièrement.

- Le nombre de lavages indiqué doit être scrupuleusement respecté.

- Ne jamais laisser les puits vides.

- Éviter de placer les barrettes sous une lumière vive.

- Vérifier l'absence de bulles dans les puits avant la mesure de DO.

8.1- PROTOCOLE OPERATOIRE

À chaque étape, respecter précisément les mêmes temps d'incubation dans chacun des puits d'analyse.

Les échantillons et le blanc sont à distribuer en double; un doublet de blancs suffit pour l'analyse simultanée de plusieurs échantillons.

Déposer directement dans les puits pré-coatés (Réactif 1) :

		Puits PGE1	Puits PGE1 + ADP	Puits Blanc
CAPTURE DE L'ANTIGENE	Réactif :	2a : 40 µL	2b : 40 µL	5 : 180 µL
	Sang total :	40 µL	40 µL	—
	Mélanger précautionneusement le contenu de chaque puits par 8-10 pipetages			
	Couvrir les puits et incuber 10 minutes à TA			
	Réactif :	3 : 100 µL	3 : 100 µL	—
	Mélanger précautionneusement le contenu de chaque puits par 8-10 pipetages			
	Couvrir les puits et incuber 30 minutes à TA			
Laver tous les puits 3 fois avec 300 µL de Réactif 4 dilué, puis ajouter immédiatement :				
FIXATION DU CONJUGUE	Réactif 6 dilué :	200 µL	200 µL	200 µL
	Couvrir les puits et incuber 30 minutes à TA			
Laver tous les puits 3 fois avec 300 µL de Réactif 4 dilué, puis ajouter immédiatement :				
REVELATION	Réactif 7 :	200 µL	200 µL	200 µL
	Incuber 5 minutes à TA, puis ajouter :			
	Réactif 8 :	100 µL	100 µL	100 µL
	Homogénéiser précautionneusement le contenu de chaque puits			
MESURE DE LA DO	Mesurer l'absorbance à 450 nm , au plus tard dans les 4 heures suivant l'arrêt de la réaction. (La plaque doit être conservée à TA.)			

8.2- CALCUL DE L'INDEX DE RÉACTIVITE PLAQUETTAIRE

L'index de réactivité plaquettaire (PRI) est calculé à partir des densités optiques (DO_{450nm}) de l'échantillon testé en présence de PGE1 seule [PGE1] ou de PGE1 et d'ADP [PGE1+ ADP], selon la formule suivante :

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

Remarque : Chaque laboratoire est tenu de définir ses propres valeurs d'interprétation spécifiques à l'antagoniste P2Y12 évalué.

Dans le but de mesurer l'efficacité d'un antagoniste P2Y12, suivre les recommandations suivantes :

- Déterminer la zone basale des valeurs de PRI (moyenne \pm 2 écarts-types) sur un groupe de patients relevant de la pathologie d'intérêt et ne recevant pas l'antagoniste P2Y12 à évaluer. A titre indicatif, le PRI de donneurs sains non traités (n=32) est compris entre 89 % et 99 % (datas issues d'étude externe).
- Déterminer, avant traitement, la valeur basale de PRI du patient testé (PRI₀) et vérifier que cette valeur est comprise dans la zone basale de PRI précédemment établie. Dans le cas contraire, se référer au paragraphe Limitations (§10) et renouveler le test si nécessaire.
- Déterminer la valeur de PRI à un instant T (PRI_T) en tenant compte des propriétés pharmacodynamiques de l'antagoniste P2Y12 évalué. Si la valeur PRI_T est toujours comprise dans la zone basale de PRI, le patient n'a pas répondu à la drogue.

En résumé, un PRI faible correspond à un patient bon répondeur tandis qu'un PRI fort indique soit un sujet sain, soit un patient mauvais répondeur. Plus le PRI est bas, plus le récepteur P2Y12 est inhibé.

9- PERFORMANCES

Répetabilité :

Deux échantillons présentant des niveaux de PRI différents sont testés 8 fois avec la même trousse :

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

Zone de mesure :

La zone de mesure de la méthode s'étend de 0 à 100 % de PRI.

Corrélation au test PLT VASP/P2Y12 (BioCytex réf. 7014, CE) :

Le test CY-QUANT VASP/P2Y12 est fortement corrélé au test cytométrique PLT VASP/P2Y12 : n= 96; r= 0,95; p< 0,001.

Interférences :

- Compte plaquettaire : sur des échantillons contenant de 50 000 à 375 000 plaquettes/ μ L, le compte plaquettaire n'a pas d'interférence significative sur le test CY-QUANT VASP/P2Y12.

- Compte de globules rouges : sur des échantillons non traités contenant de 1×10^6 à $5,8 \times 10^6$ globules rouges/ μ L, le compte de globules rouges n'a pas d'interférence significative sur le test CY-QUANT VASP/P2Y12.

- L'aspirine et les drogues anti GpIIb/IIIa n'ont pas d'interférence significative sur le test CY-QUANT VASP/P2Y12 étant donné que le biomarqueur VASP est spécifique de la cascade de signalisation du P2Y12.

10- LIMITATIONS

La trousse **CY-QUANT VASP/P2Y12** ne peut pas être utilisée sur des échantillons hémolysés et/ou activés.

11- RESPONSABILITE








L'utilisation en diagnostic *in vitro* n'est valide que dans une stricte application de la notice. Toute modification ou changement peut influencer le résultat du test.

Ne jamais intervertir ou mélanger les réactifs issus de différentes trousse. Dans les cas où ces recommandations ne seraient pas strictement respectées, aucune contestation ou remplacement du produit ne seront acceptés.

12- REFERENCES

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

13- SYMBOLES

 REF	Référence du catalogue		Utiliser jusqu'au
 IVD	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Contenu suffisant pour "n" tests
	Limites de température	 LOT	Code du lot
	Fabricant		



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 Décembre 2017