

PLATELET Gp Screen

Trousse de quantification de glycoprotéines plaquettaires

Trousse de 10 déterminations

Réf. 7008



Uniquement à usage de Recherche.

1 METHODE

Analyse cytométrique simple couleur des glycoprotéines membranaires plaquettaires GpIIa, GpIb et GpIa.

Le nombre de déterminants antigéniques est déterminé en convertissant l'intensité de fluorescence en nombre de sites par plaquette grâce à une droite standard d'étalonnage.

2 VALEURS USUELLES

L'analyse cytométrique a été réalisée sur cytomètre Coulter EPICS XL-MCL. Ces valeurs sont données uniquement à titre indicatif.

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales à partir d'une population locale de donneurs normaux.

	Citrate
GpIIa (CD61)	53 +/- 12
GpIb (CD42b)	38 +/- 11
GpIa (CD49b)	5 +/- 2,8

Les valeurs sont exprimées en nombre de molécules Gp par plaquette ($\times 10^3$).

3 REACTIFS

- **Réactif 1:** 1 flacon de 15 mL de diluant, 10 fois concentré.
- **Réactif 2a:** 1 flacon de 200 μ L, AcM anti GpIIa (CD61).
- **Réactif 2b:** 1 flacon de 200 μ L, AcM anti GpIb (CD42b).
- **Réactif 2c:** 1 flacon de 200 μ L, AcM anti GpIa (CD49b).
- **Réactif 3:** 1 flacon de 400 μ L de suspension de billes calibrées recouvertes de quantités croissantes et définies d'IgG. Le nombre de déterminants portés par chaque population de billes est indiqué sur le papillon inséré dans chaque trousse.
- **Réactif 4:** 1 flacon de 800 μ L de réactif de révélation, Ac polyclonal anti-IgG de souris couplé au FITC.

4 RECONSTITUTION ET CONSERVATION DES REACTIFS

Conservés à 2-8 °C sous leur état d'origine, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.*

• Réactif 1 **

Stabilité après ouverture: 2 mois à 2-8 °C en dehors de toute contamination. Préparer une **dilution au 1/10** en eau distillée. Préparer le volume nécessaire pour la série à tester.

Stabilité après dilution: 15 jours à 2-8 °C.

• Réactifs 2a, 2b, 2c, 4

Prêts à l'emploi.

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

• Réactif 3

Après agitation par vortex pendant 5 secondes, le réactif est prêt à l'emploi.

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

Remarques : * Ne pas congeler la trousse.

** La présence d'une cristallisation n'altère en rien la qualité du réactif. Incuber préalablement, si nécessaire, à 37 °C jusqu'à totale dissolution des cristaux.

5 RECUEIL ET TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON

• Prélèvement:

- Utiliser des tubes à prélèvement en plastique non mouillables.
- Les plaquettes devant conserver toute leur intégrité, il est impératif d'éviter tout risque d'activation durant le prélèvement.
- Anticoagulant: citrate de sodium 0,109M / 0,129M (1 volume de citrate pour 9 volumes de sang).

• Traitement de l'échantillon:

- L'échantillon doit être traité dans les **8 heures** qui suivent le prélèvement.
- Le sang doit être conservé à température ambiante (18-25 °C).
- Le test peut être réalisé soit sur sang total citraté soit sur PRP (plasma riche en plaquettes).

6 PROCEDURE

Note: Pour chacun des réactifs, le volume utilisé étant très faible, il est impératif de délivrer celui-ci au fond des tubes.

Tous les réactifs doivent être à température ambiante pour la réalisation du protocole.

6.1. Préparation des tubes

Sur un portoir, disposer 5 tubes en plastique numérotés T1 à T5.

- Dans le tube T1, pipeter **50 μ L** de sang total citraté (alternativement, pipeter 25 μ L de PRP et ajouter 25 μ L de réactif 1 dilué).

Ajouter **150 μ L** du réactif 1 dilué.

Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

- Dans le tube T2, pipeter **20 μ L** du réactif 2a (AcM anti GpIIa).
- Dans le tube T3, pipeter **20 μ L** du réactif 2b (AcM anti GpIb).
- Dans le tube T4, pipeter **20 μ L** du réactif 2c (AcM anti GpIa).
- Dans le tube T5, pipeter **40 μ L** du réactif 3 **après remise en suspension par vortex.**

6.2. Immuno-marquage des échantillons

Dans les tubes T2, T3 et T4 :

- Distribuer **20 μ L** de l'échantillon dilué (tube T1).
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes les 3 tubes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.
- Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante.

6.3. Révélation

Dans chacun des tubes T2 à T5 :

- Distribuer **20 μ L** de réactif 4.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes les 4 tubes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.
- Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante.
- Ajouter **2 mL** de réactif 1 dilué.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes les 4 tubes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

Les échantillons ainsi préparés peuvent être conservés à **2-8 °C** pendant **2 heures** avant l'analyse cytométrique.

6.4. Lecture cytométrique

Pour effectuer la lecture cytométrique, se reporter au protocole d'utilisation de l'appareil fourni par le fabricant.

La moyenne géométrique (Mn (x) ou GeoMean selon le cytomètre) est le paramètre statistique à relever pour la mesure de la fluorescence.

Notes : les logiciels Expo™ 32, CXP et RXP qui équipent les appareils Beckman Coulter, doivent être paramétrés sur OFF pour la fonction Baseline Offset.

Avant l'analyse, homogénéiser les tubes à l'aide d'un agitateur de type vortex.

• Analyse de la gamme de calibration : tube T5 (Figs 1)

Construire un cytogramme FS LOG x SS LOG. Positionner un seuil discriminant en FS Log pour éliminer les éventuels contaminants (bruit de fond de l'appareil).

Dessiner une fenêtre d'analyse "CAL" autour de la population de singlets de billes (Fig. 1a).

Créer un histogramme FL1 LOG, conditionné par la fenêtre d'analyse "CAL".

Pour des conditions d'analyses optimales, le pic de la 3ème bille (C) doit être positionné en FL1, au début de la 4ème décade. Pour y parvenir, ajuster le voltage du photomultiplicateur (PMT) FL1.

Le curseur A doit prendre en compte le premier canal.

Analyser au moins 8 000 billes dans la fenêtre "CAL".

Relever la MFI pour chacun des 3 pics de fluorescence (Fig. 1b : curseurs A, B et C) correspondant aux 3 populations de billes de calibration.

Fig. 1a : Cytogramme des billes de calibration

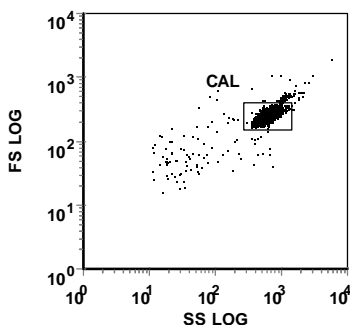
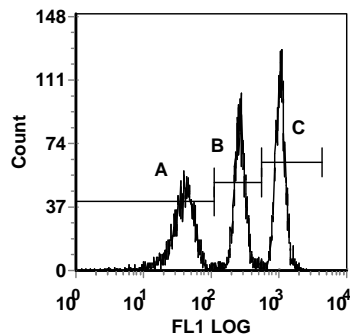


Fig.1b : Positionnement des curseurs



• Analyse des échantillons : tubes T2 à T4 (Figs 2)

Ne pas modifier le réglage de PMT FL1.

Sur le cytogramme FS LOG x SS LOG, isoler la population plaquettaire des autres cellules sanguines par une fenêtre d'analyse "PLT" (fig. 2a).

Vérifier que le seuil de détection choisi précédemment laisse apparaître la totalité du nuage de plaquettes.

Analyser au moins 3 000 évènements dans la fenêtre "PLT".

Sur l'histogramme FL1 LOG conditionné par la fenêtre "PLT", relever la moyenne de fluorescence du pic positif pour chaque échantillon analysé (fig. 2b, 2c et 2d).

Fig. 2a : Positionnement de la fenêtre d'analyse "PLT"

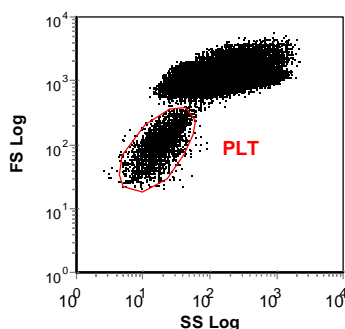


Fig. 2b : Immunomarquage CD61 Positionnement du curseur

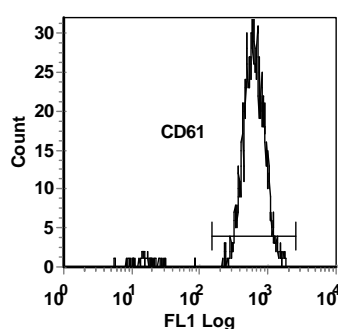


Fig. 2c : Immunomarquage CD42b Positionnement du curseur

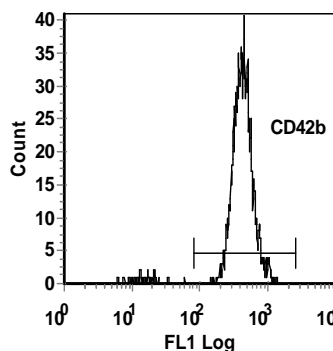
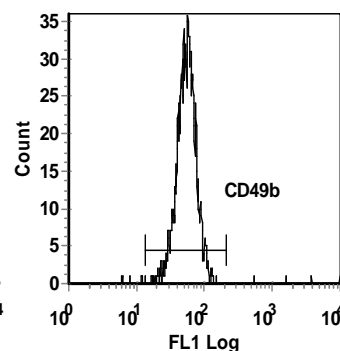


Fig. 2d : Immunomarquage CD49b Positionnement du curseur



7 RESULTATS

Traitement informatique ou graphique

7.1 Traitement informatique

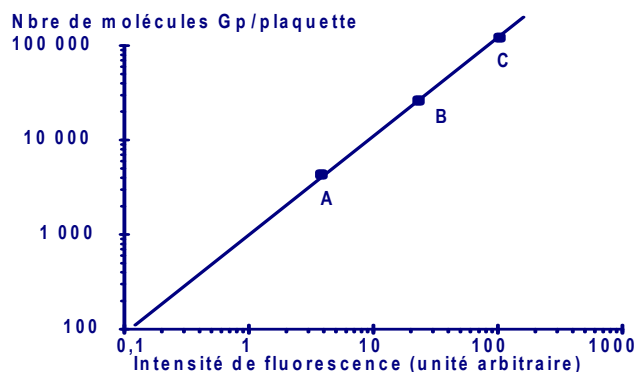
Le traitement des résultats est facilement réalisable grâce à une trame de calcul informatique disponible sur simple demande auprès de BioCytex.

7.2 Traitement graphique

Porter en abscisse le LOG₁₀ des MFI des 3 billes de calibration et en ordonnée le LOG₁₀ du nombre de molécules correspondant, valeur indiquée sur le papillon de calibration. Tracer la droite de calibration optimale, du type $LOG_{10}(ABC) = a \times LOG_{10}(MFI) + b$.

Reporter le LOG₁₀ des MFI des tubes échantillon sur la droite de calibration et en déduire le nombre de molécules correspondantes (ABC : Antibody Binding Capacity).

Exemple de droite d'étalonnage:



BIBLIOGRAPHIE

- Schlossman *et al.* eds Leucocyte Typing V, Oxford Univ. Press 1995, 1309-1315, 1615-1616.
- Schmitz G. *et al.* Thromb.Haemost. 1998; 79:885-896.
- Martin K. *et al.* J Thromb Haemost 2003; 1:2643-52.
- Ajzenberg N. *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25:1756-1760.

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