

CY-QUANT VASP/P2Y12

Per il dosaggio degli antagonisti specifici
del recettore piastrinico dell'ADP

Contenuto del kit:

- 1 micropiastra di Reagente 1 (96 pozzetti rivestiti con anti VASP)
- 3 flaconi di Reagente 2a (PGE1)
- 3 flaconi di Reagente 2b (PGE1 + ADP)
- 1 flacone di Reagente 3 (Tampone di lisi)
- 1 flacone di Reagente 4 (Soluzione di lavaggio)
- 1 flacone di Reagente 5 (Tampone di diluizione)
- 1 flaconcino di Reagente 6 (Anti-VASP-P-perossidasi)
- 1 flacone di Reagente 7 (TMB)
- 1 flacone di Reagente 8 (Soluzione di arresto)
- 1 strumento per l'estrazione dei pozzetti dalla strip di supporto

Per uso diagnostico in vitro

Cod. 7502



1- INTRODUZIONE

CY-QUANT VASP/P2Y12 è un kit per il dosaggio della molecola VASP fosforilata su serina 239 (VASP-P) nelle piastrine da sangue intero umano fresco con metodo di immunoassorbimento enzimatico (ELISA).

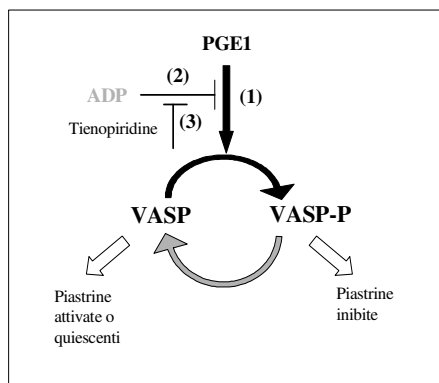
CY-QUANT VASP/P2Y12 è inteso per il dosaggio degli antagonisti specifici del recettore piastrinico dell'ADP, P2Y12.

La proteina piastrinica intracellulare VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) è non fosforilata allo stato basale.

La prostaglandina E1 (PGE1) induce la fosforilazione della VASP (1) mentre la fissazione dell'adenosina difosfato (ADP) sui recettori P2Y12 (2) induce la defosforilazione della VASP. Nelle condizioni del test, e successivamente all'aggiunta contemporanea di PGE1 e ADP, l'effetto dell'ADP prevale inducendo la defosforilazione della VASP, a meno che il recettore P2Y12 non venga bloccato in maniera efficace mediante farmaci anti-piastrinici mirati contro tale recettore (ad esempio le tienopiridine). Il livello di fosforilazione della VASP in tali condizioni riflette quindi il livello di inibizione del recettore P2Y12.

Variabilità interindividuale e fenomeni di resistenza ai farmaci anti-piastrinici sono stati ampiamente documentati (a,b). L'effetto delle tienopiridine (3) può essere messo in risalto con il kit **CY-QUANT VASP/P2Y12** mediante la resistenza della fosforilazione della VASP indotta dalla PGE1, nonostante l'aggiunta contemporanea di ADP.

Il kit **CY-QUANT VASP/P2Y12** può essere altresì impiegato per valutare gli effetti *in vitro* degli antagonisti del recettore P2Y12.



2 - PRINCIPIO DEL TEST

Dopo una prima fase di attivazione in parallelo del campione di sangue intero mediante PGE1 e PGE1+ADP (Reagente 2a e 2b), le piastrine vengono lisate (Reagente 3) e la VASP liberata è catturata da un anticorpo anti-VASP umano con cui è rivestita la micropiastra (Reagente 1). Successivamente un anticorpo anti-VASP-P umano legato alla perossidasi (Reagente 6) si fissa su un determinante antigenico della VASP, la Ser 239 fosforilata. La quantità di perossidasi legata viene misurata attraverso la sua attività sul substrato TMB (Reagente 7). Dopo il blocco della reazione (Reagente 8), l'intensità del segnale (assorbanza a 450 nm) è direttamente correlata alla concentrazione di VASP-P presente nel campione.

Viene calcolato un **indice di reattività piastrinica (PRI)** a partire dalle densità ottiche (DO_{450nm}) del campione testato in presenza solo di PGE1 [PGE1] o di PGE1 e ADP [PGE1+ADP].

3- REAGENTI

- **Reagente 1:** micropiastra da 96 pozzetti composta da 12 strip divisibili da 8 pozzetti singoli rivestiti con anticorpo monoclonale di topo anti-VASP umano in confezione richiudibile.
- **Reagente 2a:** flacone di PGE1 liofilizzata.
- **Reagente 2b:** flacone di PGE1+ADP liofilizzate.
- **Reagente 3:** flacone da 15 ml di tampone di lisi.
- **Reagente 4:** flacone da 50 ml di soluzione di lavaggio, concentrata 20 volte.
- **Reagente 5:** flacone da 50 ml di tampone di diluizione.
- **Reagente 6:** flaconcino da 1,6 ml di anticorpo monoclonale di topo anti-VASP umano legato alla perossidasi, concentrato 20 volte.
- **Reagente 7:** flacone da 25 ml di TMB (tetrametilbenzidina).
- **Reagente 8:** flacone da 15 ml di soluzione di arresto.

4- MATERIALE AUSILIARIO NECESSARIO, MA NON FORNITO

- Acqua deionizzata o distillata equilibrata a temperatura ambiente, preferibilmente sterile.
- Cronometro.
- Pipette multicanali, pipette con puntale monouso.
- Lettore di piastre dotato di filtro a 450 nm.
- Agitatore tipo "Vortex".
- Carta assorbente.

5- PRECAUZIONI

- Attenersi alle buone pratiche di laboratorio.
- Ottemperare alla normativa locale in vigore per lo smaltimento dei rifiuti.
- Considerare il sangue come potenzialmente infettivo.
- Reagente 3 – Tampone di lisi:
 - H319:** Provoca grave irritazione oculare
 - H333:** Può essere nocivo se inalato
 - EUH208:** Contiene 5-chloro-2-methyl-4-isothiazol-3-one/2-methyl-4-isothiazol-3-one (3:1). Può provocare una reazione allergica
 - P280:** Indossare guanti / indumenti protettivi / Proteggere gli occhi / il viso
 - P305 + P351 + P338:** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare
 - P304 + P340:** IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione
- Reagente 5 – Tampone di diluizione:
 - H317:** Può provocare una reazione allergica cutanea
 - P280:** Indossare guanti / indumenti protettivi / Proteggere gli occhi / il viso
 - P302 + P352:** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone

- Reagente 8 – Soluzione di arresto:

H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari

P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso

P301 + P330 + P331: IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito

P303 + P361 + P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia

P305 + P351 + P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare

P310: Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico

6- RICOSTITUZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

- Conservati a 2-8°C nella confezione originale, i reagenti rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata.

- Prima dell'uso, tutti i reagenti devono essere equilibrati a temperatura ambiente (TA 18-25°C) per almeno 30 minuti.

• Reagente 1

Pronto per l'uso. Dopo il primo utilizzo, rimettere immediatamente le strip e i pozzetti non utilizzati nella confezione richiudibile contenente il sacchetto deidratante e conservare a 2-8°C.

Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C in ambiente non contaminato.

• Reagenti 2a e 2b

Ricostituire ciascun flaconcino con **900 µl** di acqua deionizzata o distillata e omogeneizzare il contenuto mediante un agitatore tipo "Vortex" per 5 secondi.

Stabilità dopo la ricostituzione: 1 mese a 2-8°C in ambiente non contaminato.

• Reagenti 3, 5 e 8

Pronti per l'uso. Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C in ambiente non contaminato.

• Reagente 4

Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C in ambiente non contaminato.

Prima dell'uso, diluire in proporzione di **1:20** in acqua deionizzata o distillata. Per ogni pozzetto, diluire 100 µl di **Reagente 4** con 1 900 µl di acqua deionizzata o distillata.

Stabilità dopo la diluizione: 15 giorni a 2-8°C in ambiente non contaminato.

Nota: la presenza di cristalli non altera assolutamente la qualità del reagente. Se necessario, incubare a 37°C fino a dissoluzione totale dei cristalli, quindi omogeneizzare ed equilibrare a TA.

• Reagente 6

Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C in ambiente non contaminato.

Prima dell'uso, diluire il reagente in proporzione di **1:20** con il **Reagente 5**.

Per ogni pozzetto, diluire 15 µl di **Reagente 6** con 285 µl di **Reagente 5**.

Stabilità dopo la diluizione: 1 ora a TA.

Nota: una volta riempito completamente il flaconcino, pipettare con cautela per evitare la fuoriuscita del reagente.

• Reagente 7

Pronto per l'uso. Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C in ambiente non contaminato.

Nota: evitare l'esposizione alla luce e al calore, oltre alla contaminazione con ioni metallici o perossidasi.

7- PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

- Prelevare sangue venoso totale in una provetta contenente **citrato di sodio 0,109 m**, conformemente alle raccomandazioni del produttore.

- Mantenere l'integrità delle piastrine evitando qualsiasi rischio di attivazione nel corso del prelievo (agitazione, shock termico).

- La provetta deve essere riempita fino all'indicatore di riempimento, conservata a TA e non deve essere aperta prima del test.

- Trattare il campione entro le **24 ore** successive al prelievo.

8- PROCEDURA

Si raccomanda di testare un campione normale come controllo parallelamente a ciascuna serie di campioni.

Nota:

- I lavaggi possono essere effettuati a mano (pipetta multicanale) o con un lavapiastre automatico.

- Dopo ogni lavaggio manuale, svuotare i pozzetti rovesciandoli sulla piastra, tamponare quest'ultima su carta assorbente pulita, riempire i pozzetti con 300 µl di Reagente 4 diluito, quindi svuotarli completamente.

- Rispettare rigorosamente il numero di lavaggi indicato.

- Non lasciare mai i pozzetti vuoti.

- Evitare di esporre le strip alla luce.

- Verificare l'assenza di bolle nei pozzetti prima di misurare la densità ottica (DO).

8.1- PROTOCOLLO OPERATIVO

A ogni fase rispettare esattamente gli stessi tempi di incubazione in ciascun pozzetto di analisi.

I campioni e il bianco di reazione devono essere dispensati in doppio, una coppia di bianchi è sufficiente per analizzare contemporaneamente più campioni.

Dispensare direttamente nei pozzetti pre-rivestiti (Reagente 1):

		Pozzetto PGE1	Pozzetto PGE1 + ADP	Pozzetto Bianco di reazione
CATTURA DELL'ANTIGENE	Reagente:	2a: 40 µl	2b: 40 µl	5: 180 µl
	Sangue intero:	40 µl	40 µl	—
	Mescolare con cautela il contenuto di ciascun pozzetto pipettando per 8-10 volte			—
	Coprire i pozzetti e incubare per 10 minuti a TA			—
	Reagente:	3: 100 µl	3: 100 µl	—
	Mescolare con cautela il contenuto di ciascun pozzetto pipettando per 8-10 volte			—
Coprire i pozzetti e incubare per 30 minuti a TA				
Lavare tutti i pozzetti 3 volte con 300 µl di Reagente 4 diluito, quindi aggiungere immediatamente:				
FISSAZIONE DEL CONIUGATO	Reagente 6 diluito:	200 µl	200 µl	200 µl
	Coprire i pozzetti e incubare per 30 minuti a TA			
Lavare tutti i pozzetti 3 volte con 300 µl di Reagente 4 diluito, quindi aggiungere immediatamente:				
RIVELAZIONE	Reagente 7:	200 µl	200 µl	200 µl
	Incubare per 5 minuti a TA, quindi aggiungere:			
	Reagente 8:	100 µl	100 µl	100 µl
Omogeneizzare con cautela il contenuto di ciascun pozzetto				
MISURAZIONE DELLA DO	Misurare l'assorbanza a 450 nm , non più tardi di 4 ore dopo il blocco della reazione. (la piastra deve essere conservata a TA.)			

8.2- CALCOLO DELL'INDICE DI REATTIVITÀ PIASTRINICA

L'indice di reattività piastrinica (PRI) viene calcolato a partire dalle densità ottiche (DO_{450nm}) del campione testato in presenza solo di PGE1 [PGE1] o di PGE1 e ADP [PGE1+ADP] in base alla seguente formula:

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

Nota: ciascun laboratorio deve definire i propri valori di interpretazione specifici per l'antagonista P2Y12 valutato.

Allo scopo di misurare l'efficacia di un antagonista P2Y12, attenersi alle seguenti raccomandazioni:

- 1- determinare la zona basale dei valori del PRI (media \pm 2 deviazioni standard) su un gruppo di pazienti interessati dalla patologia e che non assumono l'antagonista P2Y12 sottoposto a test. A titolo indicativo, il PRI dei donatori sani non trattati (n=32) è compreso fra l'89% e il 99% (dati di uno studio esterno);
- 2- determinare, prima del trattamento, il valore basale del PRI del paziente esaminato (PRI₀) e verificare che tale valore sia compreso nella zona basale del PRI stabilita precedentemente. In caso contrario, consultare il paragrafo Limitazioni (§10) e ripetere il test se necessario;
- 3- determinare il valore del PRI in un momento T (PRI_T) tenendo presenti le proprietà farmacodinamiche dell'antagonista P2Y12 testato. Se il valore PRI_T è sempre compreso nella zona basale del PRI, il paziente non ha reagito al farmaco.

Riassumendo, un PRI basso corrisponde a un paziente che risponde bene, mentre un PRI alto indica un soggetto sano oppure un paziente che risponde male. Più basso è il PRI, più il recettore P2Y12 è inibito.

9- PRESTAZIONI

Ripetibilità:

Due campioni con diversi livelli di PRI sono stati testati 8 volte con lo stesso kit :

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

Zona di misurazione:

Il range di misura del metodo va dallo 0 al 100% del PRI.

Correlazione con il test PLT VASP/P2Y12 (BioCytex cod. 7014, CE):

Il test CY-QUANT VASP/P2Y12 è strettamente correlato al test citometrico PLT VASP/P2Y12: n=96; r=0,95; p<0,001.

Interferenze:

- Conta piastrinica: su campioni contenenti da 50.000 a 375.000 piastrine/ μ l, il numero delle piastrine non evidenzia interferenze significative con il test CY-QUANT VASP/P2Y12.

- Conta eritrocitaria: su campioni non trattati contenenti da 1×10^6 a $5,8 \times 10^6$ globuli rossi/ μ l, il numero di eritrociti non evidenzia interferenze significative con il test CY-QUANT VASP/P2Y12.

- L'aspirina e i farmaci anti-GpIIb/IIIa non evidenziano interferenze significative con il test CY-QUANT VASP/P2Y12 dato che il biomarcatore VASP è specifico per la cascata di segnalazione del P2Y12.

10- LIMITAZIONI

Il kit **CY-QUANT VASP/P2Y12** non può essere utilizzato per campioni emolizzati e/o attivati.

11- RESPONSABILITÀ

L'utilizzo per la diagnosi *in vitro* è valido solo in stretta conformità con istruzioni per l'uso. Qualsiasi modifica o cambiamento può influire sul risultato del test.








Non intervenire mai sui reagenti né mescolare reagenti di kit diversi.

In caso di mancato rispetto rigoroso delle presenti raccomandazioni, non saranno accettate contestazioni o sostituzioni del prodotto.

12 - BIBLIOGRAFIA

- (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- SIMBOLI

 REF	Numero di catalogo	 Utilizzare entro
 IVD	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	 Contenuto sufficiente per "n" saggi
 Limiti di temperatura		 Codice del lotto
 Fabbricante		

 **BIOCYTEX**
140, CH. DE L'ARMÉE D'AFRIQUE
13010 MARSIGLIA
FRANCIA
TEL.: +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX: +33 (0) 4 91 47 24 71
Versione Dicembre 2017