

CY-QUANT VASP/P2Y12

Para determinação dos antagonistas específicos do recetor plaquetário de ADP

Conteúdo do kit:

- 1 microplaca de Reagente 1 (96 poços revestidos anti-VASP)
- 3 frascos de Reagente 2a (PGE1)
- 3 frascos de Reagente 2b (PGE1 + ADP)
- 1 frasco de Reagente 3 (Solução tampão de lise)
- 1 frasco de Reagente 4 (Solução de lavagem)
- 1 frasco de Reagente 5 (Solução tampão de diluição)
- 1 frasco de Reagente 6 (Anti-VASP-P-peroxidase)
- 1 frasco de Reagente 7 (TMB)
- 1 frasco de Reagente 8 (Solução de paragem)
- 1 instrumento para extração dos poços da tira de suporte

Para Utilização no Diagnóstico *In Vitro*

Ref. 7502



1- INTRODUÇÃO

CY-QUANT VASP/P2Y12 é um kit de medição por imuno-absorção enzimática (ELISA) da molécula VASP fosforilada em serina 239 (VASP-P) nas plaquetas de sangue total humano fresco.

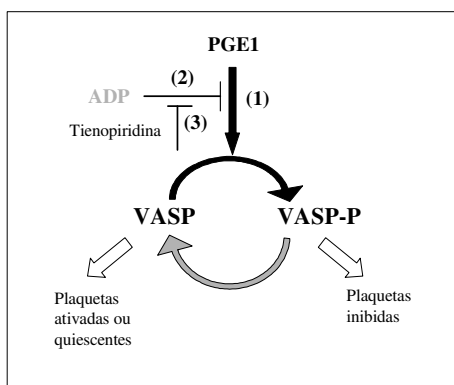
CY-QUANT VASP/P2Y12 é dedicado à determinação dos antagonistas específicos do recetor plaquetário de ADP, P2Y12.

A proteína intraplaquetária VASP (“Vasodilator Stimulated Phosphoprotein” = Fosfoproteína Estimulada por Vasodilatadores) é não fosforilada em estado basal.

A prostaglandina E1 (PGE1) induz a fosforilação de VASP (1) enquanto que a fixação de difosfato de adenosina (ADP) nos recetores P2Y12 (2) desencadeia a desfosforilação de VASP. Nas condições de teste e com a adição simultânea de PGE1 e de ADP, o efeito do ADP prevalece e induz a desfosforilação de VASP, a menos que o recetor P2Y12 seja eficazmente bloqueado por fármacos antiplaquetários visando este recetor (como as tienopiridinas). O nível de fosforilação de VASP nestas condições reflete assim o nível de inibição do recetor P2Y12.

Variações inter-individuais e fenómenos de resistência aos antiplaquetários foram largamente documentadas (a,b). O efeito das tienopiridinas (3) pode assim ser demonstrado com o kit **CY-QUANT VASP/P2Y12** pela persistência da fosforilação de VASP induzida pela PGE1, apesar da adição simultânea de ADP.

O kit **CY-QUANT VASP/P2Y12** pode ser igualmente utilizado para determinar os efeitos *in vitro* dos antagonistas do recetor P2Y12.



2- PRINCÍPIO DO TESTE

Após uma primeira etapa de ativação da amostra de sangue total em paralelo para PGE1 e PGE1+ADP (Reagentes 2a e 2b), as plaquetas são submetidas a lise (Reagente 3), permitindo assim que o VASP libertado seja capturado por um anticorpo anti-VASP humano revestido na microplaca (Reagente 1). Em seguida, um anticorpo anti-VASP-P humano ligado à peroxidase (Reagente 6) fixa-se num determinante antigénico de VASP, a Ser 239 fosforilada. A taxa de peroxidase ligada é então medida em função da sua atividade sobre o substrato TMB (Reagente 7). Após a paragem da reação (Reagente 8), a intensidade do sinal (absorvência a 450 nm) é diretamente ligada à concentração de VASP-P presente na amostra.

Um índice de reatividade plaquetária (PRI) é calculado a partir das densidades ópticas (DO_{450nm}) da amostra testada em presença de PGE1 em isolado [PGE1] ou de PGE1 e de ADP [PGE1+ ADP].

3- REAGENTES

- **Reagente 1:** microplaca 96 poços composta por 12 tiras divisíveis de 8 poços individuais cobertos por AcM de ratinho anti-VASP humano, em embalagem reutilizável.
- **Reagente 2a:** frasco de PGE1 liofilizada.
- **Reagente 2b:** frasco de PGE1 + ADP liofilizados.
- **Reagente 3:** frasco de 15 ml de tampão de lise.
- **Reagente 4:** frasco de 50 ml de solução de lavagem, 20 vezes concentrada.
- **Reagente 5:** frasco de 50 ml de solução tampão de diluição.
- **Reagente 6:** frasco de 1,6 ml de AcM de ratinho anti-VASP-P humano ligado à peroxidase, 20 vezes concentrada.
- **Reagente 7:** frasco de 25 ml de TMB (tetrametilbenzidina).
- **Reagente 8:** frasco de 15 ml de solução de paragem.

4- MATERIAL AUXILIAR NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

- Água desionizada ou destilada, equilibrada à temperatura ambiente, de preferência esterilizada.
- Cronómetro.
- Pipetas multicanais, pipetas de ponta descartável.
- Leitor de placas equipado com um filtro de 450 nm.
- Agitador tipo Vortex.
- Papel absorvente.

5- PRECAUÇÕES

- Respeitar as boas práticas de laboratório.
- Cumprir a regulamentação local em vigor quanto à eliminação de resíduos.
- Considerar o sangue como potencialmente infeccioso.
- Reagente 3 – Tampão de lise:
 - H319:** Provoca irritação ocular grave
 - H333:** Pode ser nocivo por inalação
 - EUH208:** Contém 5-chloro-2-methyl-4-isothiazol-3-one/2-methyl-4-isothiazol-3-one (3:1). Pode provocar uma reacção alérgica.
 - P280:** Usar luvas de protecção / vestuário de protecção / protecção ocular / protecção facial
 - P305 + P351 + P338:** SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível
 - P304 + P340:** EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração
- Reagente 5 – Tampão de diluição:
 - H317:** Pode provocar uma reacção alérgica cutânea
 - P280:** Usar luvas de protecção / vestuário de protecção / protecção ocular / protecção facial
 - P302 + P352:** SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes

- Reagente 8 – Solução de paragem:

H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves

P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial

P301 + P330 + P331: EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito

P303 + P361 + P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche

P305 + P351 + P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível

P310: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico

6- RECONSTITUIÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES

- Desde que conservados a 2-8° C na embalagem de origem, os reagentes mantêm-se estáveis até ao termo do prazo de validade indicado.

- Antes de utilizar, todos os reagentes devem ser equilibrados à temperatura ambiente (TA, 18-25° C) durante pelo menos 30 minutos.

● Reagente 1

Pronto a usar. Após a primeira utilização, voltar imediatamente a colocar as tiras e poços não utilizados na embalagem reutilizável contendo a bolsa desidratante e guardar à temperatura de 2-8° C.

Estabilidade após abertura: 2 meses a 2-8° C, na ausência de qualquer contaminação.

● Reagentes 2a e 2b

Reconstituir cada frasco com **900 µl** de água desionizada ou destilada e homogeneizar o conteúdo por meio de um agitador tipo Vortex durante 5 segundos.

Estabilidade após reconstituição: 1 mês a 2-8° C, na ausência de qualquer contaminação.

● Reagentes 3, 5 e 8

Prontos a utilizar. Estabilidade após a abertura: 2 meses a 2-8° C, na ausência de qualquer contaminação.

● Reagente 4

Estabilidade após a abertura: 2 meses a 2-8° C, na ausência de qualquer contaminação.

Antes de utilizar, diluir a **1/20** com água desionizada ou destilada.

Para um poço, diluir **100 µl** de **Reagente 4** com **1 900 µl** de água desionizada ou destilada.

Estabilidade após diluição: 15 dias a 2-8° C, na ausência de qualquer contaminação.

Nota: A presença de cristais não altera em nada a qualidade do reagente. Se necessário, incubar a 37° C até à total dissolução dos cristais, para depois homogeneizar e equilibrar à TA.

● Reagente 6

Estabilidade após a abertura: 2 meses a 2-8° C, na ausência de qualquer contaminação.

Antes de utilizar, diluir o reagente a **1/20** com o **Reagente 5**.

Para um poço, diluir **15 µl** de **Reagente 6** com **285 µl** de **Reagente 5**.

Estabilidade após diluição: 1 hora à TA.

Nota: Se o frasco encher totalmente, pipetar cuidadosamente para evitar que o reagente transborde.

● Reagente 7

Pronto a utilizar. Estabilidade após a abertura: 2 meses a 2-8° C, na ausência de qualquer contaminação.

Nota: Evitar a exposição à luz e ao calor, bem como a contaminação com iões metálicos ou peroxidase.

7- RECOLHA E CONSERVAÇÃO DA AMOSTRA

- Recolher sangue total venoso num tubo de ensaio com **citrato de sódio 0,109 M**, em conformidade com as recomendações do fabricante.

- Manter a integridade das plaquetas, evitando qualquer risco de ativação durante a colheita (agitação, choque térmico).

- O tubo deve ser cheio na totalidade, conservado à TA e não deve ser aberto antes da realização do teste.

- A amostra deve ser tratada no prazo de **24 horas** após a colheita.

8- PROCEDIMENTO

Recomendamos testar uma amostra normal como controlo em paralelo com cada série de amostras.

Recomendações:

- As lavagens podem ser efetuadas indiferentemente à mão (pipeta multicanais) ou por meio de uma máquina de lavagem de placas automatizada.

- Em cada lavagem manual, esvaziar os poços por inversão da placa, tamponar a placa sobre papel absorvente limpo, encher os poços com 300 µl de Reagente 4 diluído e, depois, esvaziá-los completamente.

- O número de lavagens indicado deve ser escrupulosamente respeitado.

- Nunca deixar os poços vazios.

- Evitar colocar as tiras sob luz viva.

- Comprovar a ausência de bolhas nos poços antes da medição da DO.

8.1- PROTOCOLO OPERATÓRIO

Em cada etapa, respeitar rigorosamente os mesmos tempos de incubação em cada um dos poços de análise.

Distribuir as amostras e os controlos em duplicado; um duplicado de controlos é suficiente para a análise simultânea de várias amostras.

Depositar diretamente nos poços pré- revestidos (Reagente 1):

	Poço PGE1	Poço PGE1 + ADP	Poço Controlo	
RECOLHA DO ANTIGENO	Reagente:	2a: 40 µl	2b: 40 µl	5: 180 µl
	Sangue total:	40 µl	40 µl	—
	Misturar cuidadosamente o conteúdo de cada poço em 8-10 pipetagens			—
	Cobrir os poços e incubar 10 minutos à TA			—
	Reagente:	3: 100 µl	3: 100 µl	—
	Misturar cuidadosamente o conteúdo de cada poço em 8-10 pipetagens			
Cobrir os poços e incubar 30 minutos à TA				
Lavar todos os poços 3 vezes com 300 µl de Reagente 4 diluído e adicionar imediatamente:				
FIXAÇÃO DO CONJUGADO	Reagente 6 diluído:	200 µl	200 µl	200 µl
	Cobrir os poços e incubar 30 minutos à TA			
Lavar todos os poços 3 vezes com 300 µl de Reagente 4 diluído e adicionar imediatamente:				
REVELAÇÃO	Reagente 7:	200 µl	200 µl	200 µl
	Incubar 5 minutos à TA e adicionar:			
	Reagente 8:	100 µl	100 µl	100 µl
Homogeneizar cuidadosamente o conteúdo de cada poço				
MEDIÇÃO DA DO	Medir a absorvência a 450 nm , no máximo até 4 horas após a paragem da reação. (A placa deve ser conservada à TA.)			

8.2- CÁLCULO DO ÍNDICE DE REATIVIDADE PLAQUETÁRIA

O índice de reatividade plaquetária (PRI) é calculado a partir das densidades ópticas (DO_{450nm}) da amostra testada, em presença de PGE1 em isolado [PGE1] ou de PGE1 e de ADP [PGE1+ ADP], segundo a fórmula seguinte:

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

Nota: Cada laboratório deve definir os seus próprios valores de interpretação específicos em função do antagonista P2Y12 a avaliar.

Com o fim de medir a eficácia de um antagonista P2Y12, seguir as recomendações seguintes:

- 1- Determinar a zona basal dos valores de PRI (média \pm 2 desvio padrão) num grupo de doentes apresentando a patologia em questão e que não estejam a receber o P2Y12 a avaliar. A título indicativo, o PRI de doadores saudáveis não tratados (n=32) está compreendido entre 89% e 99% (dados recolhidos de um estudo externo).
- 2- Determinar, antes do tratamento, o valor basal de PRI do doente testado (PRI₀) e verificar se tal valor se encontra dentro da zona basal de PRI anteriormente estabelecida. Caso contrário, reportar-se ao parágrafo Limitações (§10) e repetir o teste, se necessário.
- 3- Determinar o valor de PRI num momento T (PRI_T), tendo em conta as propriedades farmacodinâmicas do antagonista P2Y12 avaliado. Se o valor PRI_T ainda se encontrar contido na zona basal de PRI, o doente não respondeu ao tratamento.

Em resumo, um PRI baixo corresponde a um doente que apresenta boa resposta, enquanto que um PRI alto indica um indivíduo saudável ou um doente com resposta deficiente ao tratamento. Quanto mais baixo o PRI, maior a inibição do recetor P2Y12.

9- DESEMPENHO

Repetibilidade:

Duas amostras apresentando diferentes níveis de PRI são testadas 8 vezes com o mesmo kit:

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

Zona de medição:

A zona de medição do método estende-se de 0 a 100% de PRI.

Correlação com o teste PLT VASP/P2Y12 (BioCytex ref. 7014, CE):

O teste CY-QUANT VASP/P2Y12 está fortemente correlacionado com o teste citométrico PLT VASP/P2Y12: n= 96; r= 0,95; p< 0,001.

Interferência:

- Contagem de plaquetas: em amostras contendo de 50 000 a 375 000 plaquetas/ μ l, a contagem de plaquetas não afetou significativamente o teste CY-QUANT VASP/P2Y12.

- Contagem de glóbulos vermelhos: em amostras não tratadas contendo de 1×10^6 a $5,8 \times 10^6$ hemácias/ μ l, a contagem de glóbulos vermelhos não afetou significativamente o teste CY-QUANT VASP/P2Y12.

- A aspirina e os fármacos anti GpIIb/IIIa não afetam significativamente o teste CY-QUANT VASP/P2Y12, dado que o biomarcador VASP é específico da cascata de sinalização do P2Y12.

10- LIMITAÇÕES

O kit **CY-QUANT VASP/P2Y12** não pode ser utilizado em amostras hemolisadas e/ou ativadas.

11- RESPONSABILIDADE








A utilização no diagnóstico *in vitro* só é válida mediante a estrita aplicação das instruções. Qualquer alteração ou modificação pode influenciar o resultado do teste.

Nunca permutar ou misturar reagentes provenientes de diferentes kits. Caso estas recomendações não sejam estritamente respeitadas, não será aceite qualquer contestação ou substituição do produto.

12- REFERÊNCIAS

- (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: 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 Referência de catálogo	 Prazo de validade
 IVD Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	 Conteúdo suficiente para "n" testes
 Limites de temperatura	 LOT Código do lote
 Fabricante	



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

Versão dezembro 2017