

PLT VASP/P2Y12

Para a monitorização dos antagonistas específicos do ADP Receptor Plaquetário

Para Utilização no Diagnóstico *In Vitro*

Dispositivo de 10 Testes

Ref. 7014



As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.



1 INTRODUÇÃO

O dispositivo **PLT VASP/P2Y12** destina-se ao acompanhamento dos antagonistas específicos do receptor plaquetário por ADP, P2Y12.

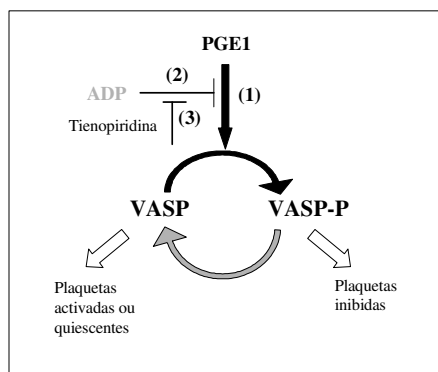
A proteína intraplaquetária VASP ("Vasodilator Stimulated Phosphoprotein") não é fosforilada em estado basal.

A fosforilação desta proteína é regulada pela via de AMPc (Adenosina Monofosfato cíclico). A PGE1 (Prostaglandina E1) activa esta via (1), enquanto que o ADP (Difosfato de Adenosina) a inibe por acção nos receptores P2Y12 (2).

Nas condições de teste, a proteína VASP sob a forma fosforilada traduz o estado inibido do receptor P2Y12, enquanto que a sua forma não fosforilada está ligada à disponibilidade do receptor.

Variações inter-individuais e a resistência às tienopiridinas foram largamente descritas na literatura (3) (4). O efeito das tienopiridinas (3) pode ser demonstrado, através do dispositivo **PLT VASP/P2Y12**, pela persistência da fosforilação de VASP induzida pela PGE1, apesar da adição simultânea de ADP.

O dispositivo **PLT VASP/P2Y12** também pode ser utilizado para avaliar os efeitos *in vitro* dos antagonistas do receptor P2Y12.



2 PRINCÍPIO

A amostra sanguínea é incubada paralelamente em presença apenas de PGE1 ou de PGE1 e ADP. Após uma permeabilização celular, a molécula VASP sob a forma fosforilada é marcada por um anticorpo monoclonal específico (clone 16C2 (6)) em imunofluorescência indirecta sem lavagem. A análise em citometria de fluxo, em dupla coloração, permite comparar as duas condições testadas e avaliar, para a amostra analisada, a capacidade do ADP para inibir esta fosforilação. Um **índice de reactividade plaquetária (PRI)** é assim calculado a partir de médias de fluorescência corrigidas (MFic) da amostra, testada em presença de PGE1 em isolado (PGE1) ou de PGE1 e ADP (PGE1 + ADP).

3 REAGENTES FORNECIDOS

- **Reagente 1:** 1 frasco de 60 ml de diluente.
- **Reagente 2a:** 1 frasco de PGE1.
- **Reagente 2b:** 1 frasco de PGE1 + ADP.
- **Reagente 3:** 1 frasco de 300 µl de fixador.
- **Reagente 4a:** 1 frasco de 200 µl de anticorpo monoclonal de rato anti VASP-P + permeabilizante.
- **Reagente 4b:** 1 frasco de 100 µl de controlo isotópico negativo (Anticorpo monoclonal de rato) + permeabilizante.
- **Reagente 5:** 1 frasco de 300 µl de reagente de revelação, anticorpo policlonal anti IgG de rato, ligado a FITC + contramarcador anti-plaquetário ligado à PE (anti CD61-PE) + permeabilizante.

4 MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

- Agitador tipo Vórtex.
- Cronómetro.
- Citómetro.
- Pipetas reguláveis de ponta descartável (10 µl).
- Pipetas (1 e 2 ml).
- Tubos de hemólise para citómetro.
- Água destilada, água desionizada ou água para preparações injectáveis.

5 RECONSTITUIÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES

Quando conservados à temperatura de 2-8°C no seu estado original, os reagentes mantêm-se estáveis até ao termo do prazo de validade indicado na embalagem.

Nota: Não congelar o dispositivo.

- **Reagentes 1, 3, 4a, 4b e 5:** prontos a utilizar.

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

- **Reagentes 2a e 2b:**

Reconstituir cada frasco com 400 µl de água destilada e homogeneizar durante 5 segundos por meio de um agitador tipo Vórtex.

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

6 PRECAUÇÕES

- Respeitar as boas práticas de laboratório.
- A eliminação dos resíduos deve processar-se em conformidade com a regulamentação local em vigor.
- O sangue deve ser considerado como potencialmente infeccioso.
- Reagente 3 – Fixador :
 - H351:** Suspeito de provocar cancro
 - H319:** Provoca irritação ocular grave
 - H317:** Pode provocar uma reacção alérgica cutânea
 - H333:** Pode ser nocivo em caso de inalação
 - P201:** Pedir instruções específicas antes da utilização
 - 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. Continuar a enxaguar
 - P302 + P352:** Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial
- Reagentes 4a – Anti VASP-P, 4b – Controlo isotópico negativo, 5 – Reagente de revelação :
 - H319:** Provoca irritação ocular grave
 - 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. Continuar a enxaguar

7 RECOLHA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

- **Colheita:**
 - Utilizar tubos de colheita em plástico não molhável.
 - As plaquetas devem conservar toda a sua integridade, sendo imperativo evitar qualquer risco de activação durante a colheita (agitação, choque térmico).
 - Anticoagulante: **citrato de sódio 0,109 M ou 0,129 M** (1 volume de citrato para 9 volumes de sangue).
- **Tratamento da amostra:**
 - A amostra deve ser tratada nas **48 horas** que se seguem à sua recolha.
 - O tubo de sangue deve estar cheio, conservado à temperatura ambiente (18 - 25°C) e não deve ser aberto antes do teste.
 - O teste é efectuado em sangue total com citrato.

8 PROCEDIMENTO

Nota: Para cada um dos reagentes, como o volume utilizado é reduzido (10 µl), recomenda-se a sua deposição no fundo dos tubos.

Todos os reagentes devem encontrar-se à temperatura ambiente para a realização do protocolo.

Recomendamos, como controlo, a utilização de uma amostra normal em paralelo, em cada série de amostras a testar.

8.1 Preparação dos tubos e da amostra

Num suporte, dispor, por cada amostra, 3 tubos em plástico identificados como T1, T2 e T3:

- Depositar **10 µl** de **Reagente 2a** no tubo T1.
- Depositar **10 µl** de **Reagente 2b** nos tubos T2 e T3.
- Distribuir **10 µl** de sangue total nos tubos T1, T2 e T3.
- Homogeneizar durante 1 a 2 segundos por meio de um agitador tipo Vórtex, regulado para baixa velocidade.
- Incubar durante **10 minutos** à temperatura ambiente.

8.2 Fixação

- Distribuir **10 µl** de **Reagente 3** nos tubos T1, T2 e T3.
- Homogeneizar durante 1 a 2 segundos por meio de um agitador tipo Vórtex, regulado para baixa velocidade.
- Incubar durante **5 minutos** à temperatura ambiente.

8.3 Permeabilização celular e marcação imunológica

- Distribuir **10 µl** de **Reagente 4a** nos tubos T1 e T2.
- Distribuir **10 µl** de **Reagente 4b** no tubo T3.
- Homogeneizar durante 1 a 2 segundos por meio de um agitador tipo Vórtex, regulado para baixa velocidade.
- Incubar durante **5 minutos** à temperatura ambiente.

8.4 Revelação e contramarcção plaquetária

- Distribuir **10 µl** de **Reagente 5** nos tubos T1, T2 e T3.
- Homogeneizar durante 1 a 2 segundos por meio de um agitador tipo Vórtex, regulado para baixa velocidade.
- Incubar durante **5 minutos** à temperatura ambiente.
- Distribuir **2 ml** de **Reagente 1** nos 3 tubos.
- Homogeneizar durante 1 a 2 segundos por meio de um agitador tipo Vórtex regulado para rápida velocidade.
- Incubar os tubos durante **20 minutos** à temperatura ambiente e protegidos da luz.

As amostras assim preparadas podem ser conservadas à temperatura ambiente e protegidas da luz durante 2 horas antes da sua análise no citómetro de fluxo.

8.5 Análise citométrica

Para efectuar a leitura citométrica, consultar o protocolo de utilização do aparelho fornecido pelo fabricante.

A opção para o cálculo estatístico das médias de fluorescência (MFI) é a média geométrica (Mn (y) ou GeoMean consoante o citómetro).

Antes da análise, homogeneizar os tubos durante 1 a 2 segundos por meio de um agitador tipo Vórtex.

Analisar pelo menos 5000 elementos plaquetários na janela "B".

Para a realização do protocolo são necessários um citograma FS LOG x SS LOG e um citograma FL1 LOG x FL2 LOG.

• Análise do tubo T1:

- No citograma FS LOG x SS LOG, isolar a nuvem celular, incluindo as plaquetas, numa janela de análise "A". Os leucócitos, localizados ao nível da seta, são excluídos desta janela "A" (Fig. 1).
- Limitar o citograma FL1 LOG x FL2 LOG pela janela de análise "A".
- Ajustar a tensão do fotomultiplicador FL2, a fim de posicionar a nuvem FL2⁺ no princípio da 3ª década.
- Ajustar a tensão do fotomultiplicador FL1, a fim de posicionar o fundo da nuvem FL1⁺ / FL2⁺ no princípio da 2ª década.
- Posicionar um limite de discriminação em FL2 LOG para eliminar o máximo de elementos FL2⁻ (ruído de fundo do aparelho e detritos celulares).
- No citograma, isolar a população plaquetária FL2⁺ dos detritos celulares FL2⁻ numa janela de análise "B" (Fig. 2) e determinar a MFI no eixo das ordenadas.

Nota: em certas amostras, uma população de agregados aparece sob a forma de cometa (simbolizada por uma seta) e situa-se à esquerda da nuvem de interesse. No tubo T1, posicionar a janela B de tal maneira que toda a nuvem plaquetária fique incluída e que o máximo de agregados fique excluído.

• Análise dos tubos T2 e T3:

- Sem modificar a posição da janela "B" e as regulações das PMT SS, FS, FL1 e FL2 anteriormente optimizadas, analisar os tubos T2 e T3 (Figs. 3, 4).
- Determinar a MFI no eixo dos Y dos tubos T2 e T3.

Apresentamos, em seguida, as figuras obtidas num aparelho Beckman Coulter de tipo EPICS XL:

Fig. 1: Posicionamento da janela de análise "A" no tubo T1

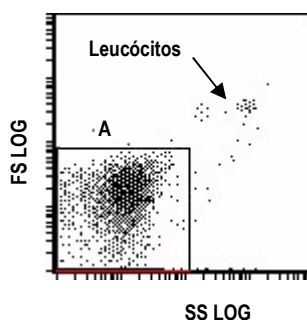


Fig. 2: Posicionamento da janela "B" para o tubo T1 (AcM anti VASP-P, condição PGE1)

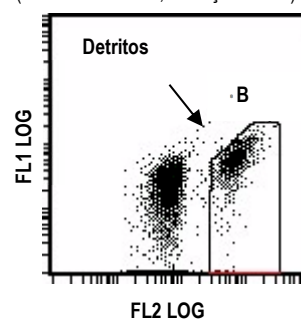


Fig. 3: Análise do tubo T2 (AcM anti VASP-P, condição PGE1+ADP)

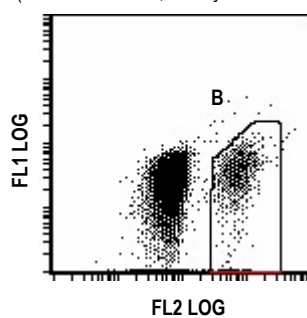
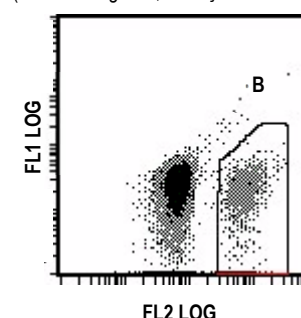


Fig. 4: Análise do tubo T3 (Controlo negativo, condição PGE1+ADP)



Em baixo, as figuras obtidas num aparelho Becton Dickinson de tipo FACSCalibur:

Fig. 1: Posicionamento da janela de análise "A" no tubo T1

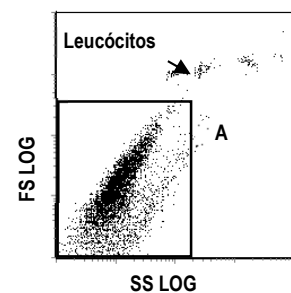


Fig. 2: Posicionamento da janela "B" para o tubo T1 (AcM anti VASP-P, condição PGE1)

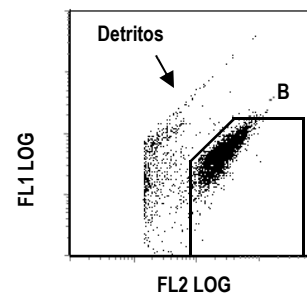


Fig. 3: Análise do tubo T2 (AcM anti VASP-P, condição PGE1+ADP)

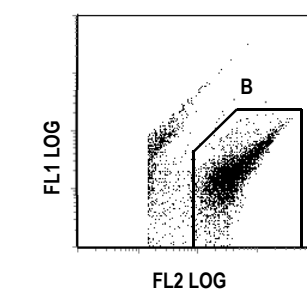
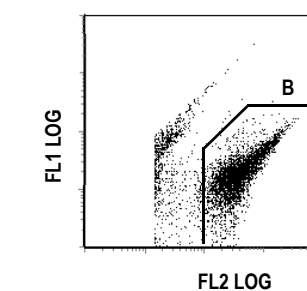


Fig. 4: Análise do tubo T3 (Controlo negativo, condição PGE1+ADP)



Nota: Graças à utilização do controlo isotópico negativo, não é necessária qualquer regulação das compensações. No entanto, a regulação das compensações não afecta os resultados do teste.

8.6 Análise dos resultados

Depois da análise citométrica, determinar o valor das MFI corrigidas (MFlc) dos tubos T1 e T2.

A MFlc é obtida subtraindo o valor de MFI obtido no controlo negativo (tubo T3) aos valores de MFI obtidos no AcM anti VASP-P (tubos T1 ou T2).

$$\text{MFlc}_{(PGE1)} = \text{MFlc}_{(T1)} = \text{MFI}_{(T1)} - \text{MFI}_{(T3)}$$

$$\text{MFlc}_{(PGE1 + ADP)} = \text{MFlc}_{(T2)} = \text{MFI}_{(T2)} - \text{MFI}_{(T3)}$$

9 INTERPRETAÇÃO DO TESTE

O índice de reactividade plaquetária (PRI) é calculado a partir das médias de fluorescência corrigidas (MFlc), da amostra testada em presença de PGE1 por si só (PGE1) ou de PGE1 e de ADP (PGE1+ADP), segundo a fórmula seguinte:

$$\text{Índice de reactividade plaquetária (PRI)} = \frac{[\text{MFlc}_{PGE1} - \text{MFlc}_{(PGE1 + ADP)}] / \text{MFlc}_{PGE1} \times 100}$$

Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de interpretação específicos ao antagonista P2Y12 avaliado.

Tratamento com clopidogrel:

Variações inter-individuais na resposta ao tratamento clopidogrel foram demonstradas com o dispositivo **PLT VASP/P2Y12** (1):

Os PRI dos doentes (n=33) com doença cardiovascular isquémica, tratados com clopidogrel durante mais de uma semana, variam de 6,6% a 85,8%.

Má resposta ao clopidogrel **85,8%**  **6,6%** Boa resposta ao clopidogrel

Com o objectivo de medir a eficácia de um antagonista P2Y12, como o clopidogrel, seguir as recomendações seguintes:

1- Determinar a zona basal dos valores de PRI (**expressa em média \pm 2 desvios padrão**) num grupo de doentes que apresentem a patologia em questão e não estejam a receber o antagonista P2Y12 em avaliação.

A título indicativo, de acordo com a publicação de Aleil B. *et al.* (1), o PRI dos doentes (n=34) que sofriam de doença cardiovascular isquémica, não tratados com clopidogrel, é igual a $79,0 \pm 4,1\%$ (expresso em média \pm desvio-padrão).

2- Antes do tratamento, determinar o valor basal do PRI do doente testado (PRI₀) e verificar se este valor está compreendido na zona basal do PRI anteriormente estabelecida. Caso contrário, consultar o parágrafo Limitações (§11) e, se necessário, repetir o teste.

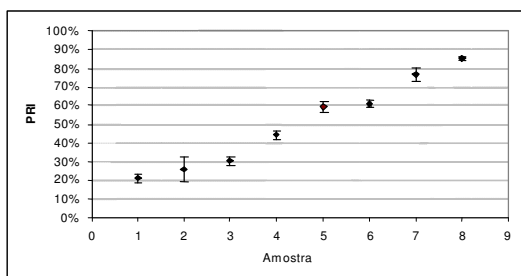
3- Determinar o valor de PRI num momento T (PRI_T), tendo em conta as propriedades farmacodinâmicas do antagonista P2Y12 avaliado. Se o valor PRI_T estiver ainda compreendido na zona basal de PRI, o doente não respondeu ao medicamento.

10 DESEMPENHOS

O teste **PLT VASP/P2Y12** foi validado para os instrumentos Becton Dickinson tipo FACSCalibur e Beckman Coulter tipos XL e XL MCL.

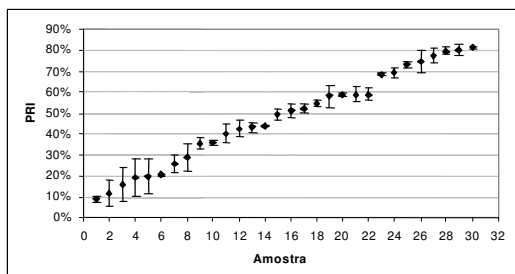
Repetibilidade:

Algumas amostras (n=8) apresentando diferentes níveis de resposta (PRI) foram testadas 5 vezes com o mesmo dispositivo. As variações estão representadas a seguir (média \pm desvio-padrão):



Reprodutibilidade inter lotes:

Algumas amostras (n=30) apresentando diferentes níveis de resposta (PRI) foram testadas com 1 dispositivo de 3 lotes diferentes. As variações estão representadas no gráfico seguinte (média \pm desvio-padrão):



Zona de medição:

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

Interferências:

Aspirina:

Segundo a publicação de Aleil B. *et al.* (1), a aspirina não interfere significativamente com o teste **PLT VASP/P2Y12** (n=67): p = 0,328.

Contagem de plaquetas:

Nas amostras não tratadas contendo 50.000 a 300.000 plaquetas/ μ l de sangue, a contagem de plaquetas não interfere significativamente com o teste **PLT VASP/P2Y12**.

Abciximab:

Segundo a publicação de Van Werkum J. *et al.* (2), abciximab não interfere significativamente com o teste **PLT VASP/P2Y12** (n=11): p=0,89.

Correlação com a agregação:

Como descrito na publicação de Aleil B. *et al.* (1), o teste **PLT VASP/P2Y12** está fortemente relacionado com a inibição da agregação induzida por ADP após adição de um antagonista específico do P2Y12: r = 0,72; p < 0,0001.

11 LIMITAÇÕES

- O dispositivo **PLT VASP/P2Y12** não pode ser utilizado em amostras hemolisadas.

- O dispositivo **PLT VASP/P2Y12** não deve ser utilizado em amostras que apresentem uma contagem de glóbulos vermelhos abaixo do limite inferior dos valores normais. Neste caso, recomenda-se repetir o teste numa nova amostra recolhida pelo menos 24 horas mais tarde.

- Para certas amostras, a análise citométrica imediata, após adição de 2 ml de Reagente 1 no fim do protocolo, pode revelar uma lise incompleta dos glóbulos vermelhos. Isto traduz-se numa superposição entre a nuvem plaquetária e a nuvem de glóbulos vermelhos. Neste caso, por forma a permitir a lise completa dos glóbulos vermelhos, conservar esta amostra durante mais 5 minutos à temperatura ambiente, antes de proceder à agitação dos tubos por Vórtex e renovar a análise citométrica.








12 RESPONSABILIDADE

A utilização para diagnóstico *in vitro* só é considerada válida mediante aplicação estrita deste folheto informativo. Qualquer modificação ou alteração, bem como a utilização de reagentes de outros lotes, pode influenciar os resultados dos testes. Nestas circunstâncias, não será aceite qualquer contestação ou substituição do produto.

13 REFERÊNCIAS

- (1) ALEIL B. *et al.* (2005) *J Thromb Haemost* 3: 85-92.
- (2) VAN WERKUM J. *et al.* (2007) *J Thromb Haemost* 5: 881-883.
- (3) BONELLO L. *et al.* (2009) *Am J Cardiol.* 103(1):5-10.
- (4) BARRAGAN P. *et al.* (2003) *Cathet Cardiovasc Intervent* 59: 295-302.
- (5) GURBEL P.A. *et al.* (2003) *Circulation* 107: 2908-2913.
- (6) MULLER I. *et al.* (2003) *Thromb Haemost* 89: 783-787.
- (7) GEIGER J. *et al.* (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2007-2011.
- (8) SCHWARZ U.R. *et al.* (1999) *Thromb Haemost* 82: 1145-1152.

14 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		

 **BIOCYTEX**

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

Versão Março 2018