

# PLT VASP/P2Y12

Zur Verlaufskontrolle der spezifischen Plättchen-ADP-Rezeptorantagonisten  
Für die In-Vitro-Diagnostik



Kit mit 10 Tests

Artikel-Nr.7014



**Außerhalb Europas ist dieses Produkt nur für Forschungszwecke bestimmt.**

## 1 EINLEITUNG

Der **PLT VASP/P2Y12**-Kit ist für das Monitoring von ADP-spezifischen Rezeptor (P2Y12) Antagonisten bestimmt.

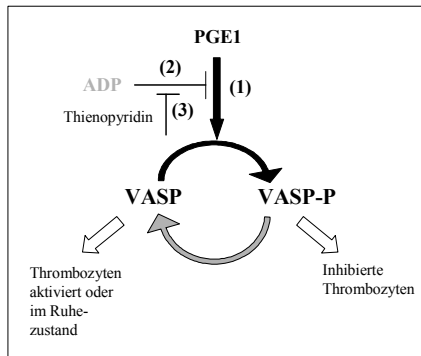
Das in den Thrombozyten befindliche VASP-Protein (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) ist in seinem Basalzustand nicht phosphoryliert.

Die Phosphorylierung von VASP wird über den cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) Weg geregelt. Während PGE1 (Prostaglandin E1) diesen Weg aktiviert (1), wird er durch ADP (Adenosindiphosphat), das auf die P2Y12-Rezeptoren (2) wirkt, gehemmt.

Unter Testbedingungen korreliert phosphoryliertes VASP mit der Inhibition des P2Y12-Rezeptors, während unphosphoryliertes VASP mit der aktiven Form des P2Y12-Rezeptors korreliert.

Über inter-individuelle Variationen und die Resistenz gegenüber Thienopyridinen gibt es zahlreiche Veröffentlichungen (3) (4). Die Wirkung der Thienopyridine (3) kann mit Hilfe des **PLT VASP/P2Y12**-Kits nachgewiesen werden, da in Anwesenheit von Thienopyridinen die PGE1 induzierte VASP-Phosphorylierung trotz gleichzeitiger Zugabe von ADP erhalten bleibt.

Der **PLT VASP/P2Y12**-Kit kann auch für die Evaluierung von *In-vitro*-Wirkungen von P2Y12-Rezeptorantagonisten verwendet werden.



## 2 PRINZIP

Die Blutprobe wird zunächst mit PGE1 alleine oder mit PGE1 und ADP inkubiert. Nach Permeabilisierung der Zellen wird phosphoryliertes VASP mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (Klon 16C2 (6)) durch indirekte Immunfluoreszenz ohne Waschen markiert. Mittels zweifarbiger Durchflusszytometrie können die zwei getesteten Zustände verglichen werden und in jeder Probe kann die Kapazität des ADPs bestimmt werden, die VASP Phosphorylierung zu inhibieren.

Der **Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI)** wird unter Verwendung der korrigierten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFIC) berechnet, die für PGE1 (PGE1) alleine oder in Anwesenheit von PGE1 und ADP (PGE1+ ADP) getestet wurden.

## 3 Kitkomponenten

- **Reagens 1:** 1 x 60 ml Verdünnungsmittel
- **Reagens 2a:** 1 x Fläschchen PGE1
- **Reagens 2b:** 1 x Fläschchen PGE1 + ADP
- **Reagens 3:** 1 x Fläschchen (300 µl) Fixiermittel
- **Reagens 4a:** 1 x Fläschchen (200 µl) monoklonale anti-VASP-P Maus-Antikörper + Permeabilisierungsmittel
- **Reagens 4b:** 1 x Fläschchen (100 µl) isotypische Negativkontrolle (monoklonaler Maus-Antikörper) + Permeabilisierungsmittel
- **Reagens 5:** 1 x Fläschchen (300 µl) Farbreagens, polyklonaler, FITC-konjugierter Anti-IgG-Maus-Antikörper + PE-konjugiertes Thrombozyten- Gegenfärbereagens (Anti-CD61-PE) + Permeabilisierungsmittel

## 4 NOTWENDIGE MATERIALIEN, DIE NICHT MITGELIEFERT WERDEN

- Vortex Mischer
- Timer
- Durchflusszytometer
- Verstellbare Pipetten mit Einwegspitzen (10 µl)
- Pipetten (1 und 2 ml)
- Hämolyseröhrchen für Durchflusszytometer
- Destilliertes Wasser, deionisiertes Wasser oder Wasser für Injektionsmittel

## 5 REKONSTITUTION UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Das ungeöffnete Testkit und dessen Inhalt kann bei 2 bis 8 °C bis zu dem auf dem Etikett befindlichen Verfallsdatum aufbewahrt werden.

**Hinweis:** Das Testkit darf nicht eingefroren werden.

- **Reagenzien 1, 3, 4a, 4b und 5:** gebrauchsfertig  
Stabilität nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2 bis 8 °C wenn keinerlei Kontamination vorliegt.

- **Reagenzien 2a und 2b:**

Fläschchen mit je 400 µl destilliertem Wasser rekonstituieren und fünf Sekunden auf einem Vortex-Mischer homogenisieren.

Rekonstituierte Reagenzien sind 1 Monat bei 2 bis 8 °C haltbar, wenn keinerlei Kontamination vorliegt.

## 6 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Einhaltung der allgemeinen Laborvorschriften.
- Entsorgung von Abfällen entsprechend der örtlich geltenden Vorschriften
- Blut ist als potenziell infektiös anzusehen.
- Reagens 3 enthält zwischen 2% und 5 % Paraformaldehyd.  
R40 – Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.  
R43 – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.  
S36/37 – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
- Alle Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid und müssen unter Einhaltung von Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Wenn diese Lösungen über das Spülbecken entsorgt werden, müssen sie mit einer großen Menge Wasser verdünnt werden, um die Bildung von Metallaziden zu vermeiden, die bei entsprechender Konzentration zur Explosion führen können.

## 7 PROBENENTNAHME UND BEARBEITUNG VON PROBEN

### • Probenentnahme:

- Nicht benetzbare Blutabnehmeröhrchen aus Kunststoff verwenden.
- Die Thrombozyten müssen völlig unversehrt bleiben. Die Aktivierung der Thrombozyten bei Probenahme ist unbedingt zu vermeiden (Schütteln, Theroschock).
- Antikoagulationsmittel: **Natriumzitrat 0,109 M oder 0,129 M** (9 Volumen Blut, 1 Volumen Zitrat verwenden).

### • Probenlagerung:

- Die Blutprobe muss innerhalb von **48 Stunden** nach der Entnahme bearbeitet werden.
- Das Blutentnahmeröhrchen muss voll sein (4 ml), bei Raumtemperatur aufbewahrt werden (18 – 25 °C) und darf vor dem Test nicht geöffnet werden.
- Der Test wird mit zitriertem Gesamtblut durchgeführt.

## 8 VERFAHREN

**Hinweis:** Um gute Ergebnisse zu erzielen sollte beim Pipettieren von **kleinen Volumina (10 µl)** darauf geachtet werden, **dass die Reagenzien direkt auf den Röhrchenboden pipettiert werden.**

Für die Durchführung des Tests müssen alle Reagenzien Raumtemperatur besitzen.

**Wir empfehlen eine normale Probe, als Kontrolle parallel zu jeder zu testenden Probenreihe mitlaufen zu lassen.**

### 8.1 Vorbereitung der Röhrrchen und der Probe

Auf einem Gestell je Probe 3 Kunststoffröhrrchen anordnen, die mit T1, T2 und T3 gekennzeichnet sind:

- 10 µl Reagens 2a in das Röhrrchen T1 pipettieren.
- 10 µl Reagens 2b in die Röhrrchen T2 und T3 pipettieren.
- 10 µl Gesamtblut in die Röhrrchen T1, T2 und T3 pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex-Mischer bei niedriger Geschwindigkeit, homogenisieren.
- 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

### 8.2 Fixierung

- 10 µl Reagens 3 in die Röhrrchen T1, T2 und T3 pipettieren.
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex-Mischer homogenisieren.
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

### 8.3 Permeabilisierung der Zellen und Immunmarkierung

- 10 µl Reagens 4a in die Röhrrchen T1 und T2 pipettieren
- 10 µl Reagens 4b in das Röhrrchen T3 pipettieren
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex-Mischer homogenisieren
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

### 8.4 Fluoreszenzmarkierung und Gegenfärbung der Thrombozyten

- 10 µl Reagens 5 in die Röhrrchen T1, T2 und T3 pipettieren
- 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex-Mischer homogenisieren
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 ml Reagens 1 in jedes der 3 Röhrrchen pipettieren und die Röhrrchen sofort bei 2 bis 8 °C bis zur Messung aufbewahren

Die so vorbereiteten Proben können vor der Durchflusszytometrie 2 Stunden bei 2 bis 8 °C aufbewahrt werden.

### 8.5 Durchflusszytometrische Analyse

Für die Analyse der Messungen ist das Anwendungsprotokoll des Herstellers des verwendeten Durchflusszytometers zu berücksichtigen.

Für die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wird der geometrische Mittelwert (Mn (y) oder der GeoMean, je nach Durchflusszytometer) herangezogen.

**Vor der Analyse jedes Röhrrchen 1 bis 2 Sekunden mit einem Vortex-Mischer durchmischen**

**Im Fenster "B" mindestens 5 000 Thrombozytenereignisse analysieren.**

Für die Erstellung des Protokolls sind ein FS LOG x SS LOG-Zytopogramm und ein FL1 LOG x FL2 LOG-Zytopogramm erforderlich.

- Analyse des Röhrrchens T1:
  - Auf dem Zytopogramm FS LOG x SS LOG die Thrombozyten-Zellwolke durch ein Analysefenster "A" isolieren. Die Leukozyten, die sich im Bereich des Pfeils befinden, liegen außerhalb des Fensters "A" (Abb. 1).
  - Das FL1 LOG x FL2 LOG-Zytopogramm mit dem Analysefenster "A" eingrenzen.
  - Die Spannung des Photomultiplikators FL2 so einstellen, dass die Wolke FL2<sup>+</sup> am Anfang der 3. Dekade positioniert wird.
  - Die Spannung des Photomultiplikators FL1 so einstellen, dass der untere Teil der Wolke FL1<sup>+</sup> / FL2<sup>+</sup> am Anfang der 2. Dekade positioniert wird.
  - Eine Diskriminierungsschwelle im FL2 LOG setzen, um möglichst viele FL2-Ereignisse zu eliminieren (Grundrauschen des Geräts und Zelldebris).
  - Auf dem FL1 LOG x FL2LOG Zytopogramm mit einem Analysefenster "B" (Abb. 2) die Thrombozytenpopulation FL2<sup>+</sup> von den Zellresten FL2<sup>-</sup> isolieren und die MFI auf der y-Achse ablesen.

**Hinweis:** Bei bestimmten Proben erscheint eine Zelldebrispopulation in Kometenform (durch den Pfeil symbolisiert) die sich links von der entsprechenden Wolke befindet. Das Fenster "B" während der Analyse von Röhrrchen T1 so setzen, dass die gesamte Thrombozytenwolke eingeschlossen und ein möglichst großer Teil des Zelldebris ausgeschlossen wird.

- Analyse der Röhrrchen T2 und T3:
  - Ohne die Position des Fensters "B" und die zuvor optimierten Einstellungen von SS, FS, FL1 und FL2 PMT zu ändern, die Röhrrchen T2 und T3 (Abb. 3 und 4) analysieren.
  - Die MFI auf der y-Achse der Röhrrchen T2 und T3 ablesen (Abb. 3 und 4).

Die Abbildungen unten entstanden mit einem Beckman Coulter-Gerät, Modell EPICS XL:

Abb. 1: Positionierung des Analysefensters "A" auf das Röhrrchen T1

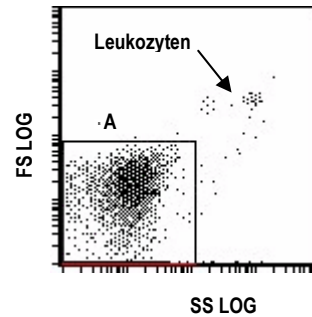


Abb. 2: Positionierung des Analysefensters "B" auf das Röhrrchen T1 (Mab anti-VASP-P, Kondition PGE1)

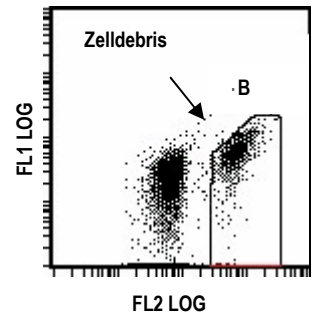


Abb. 3: Analyse des Röhrrchens T2 (Mab-anti VASP-P, Kondition PGE1+ADP)

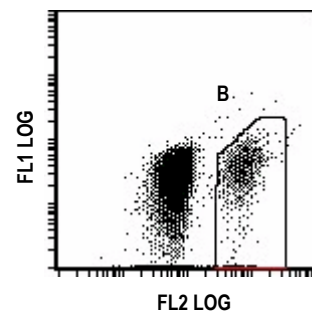
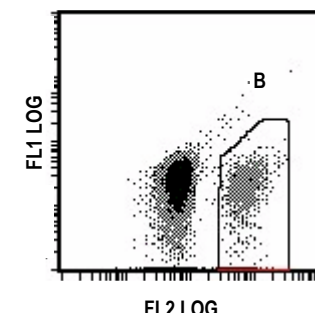


Abb. 4: Analyse des Röhrrchens T3 (Negativkontrolle, Kondition PGE1+ADP)



Die Abbildungen unten entstanden mit einem Becton Dickinson-Gerät, Modell FACSCalibur:

Abb.1: Positionierung des Analysefensters "A" auf das Röhrrchen T1

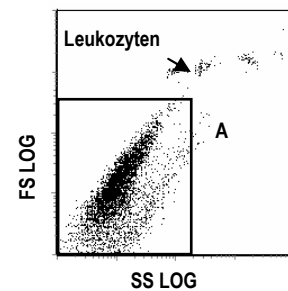


Abb. 2: Positionierung des Analysefensters "B" auf das Röhrrchen T1 (MAB-anti VASP-P, Kondition PGE1)

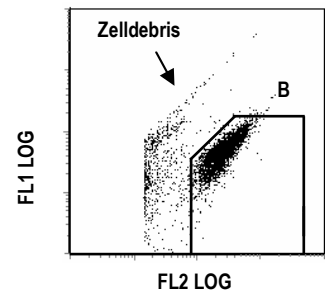


Abb. 3: Analyse des Röhrrchens T2 (Mab anti-VASP-P, Kondition PGE1+ADP)

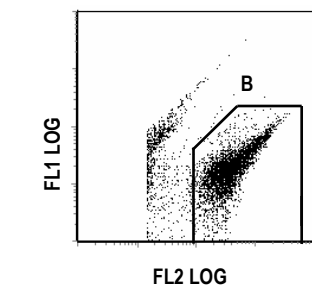
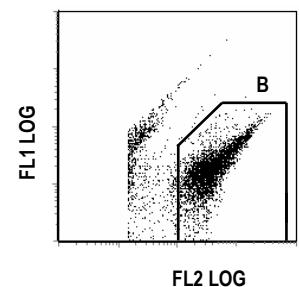


Abb. 4: Analyse des Röhrrchens T3 (Negativkontrolle, Kondition PGE1+ADP)



**Hinweis:** Durch die Verwendung der isotypischen Negativkontrolle ist keinerlei Kompensierungseinstellung erforderlich. Trotzdem werden die Testergebnisse durch Kompensierungseinstellungen nicht beeinträchtigt.

### 8.6 Analyse der Ergebnisse

Im Anschluss an die durchflusszytometrische Analyse ist der Wert für die korrigierten MFI (MFI<sub>c</sub>) der Röhrcchen T1 und T2 zu bestimmen. Zur Erstellung des MFI<sub>c</sub> wird der MFI-Wert, der für die Negativkontrolle bestimmt wurde (Röhrcchen T3) von den MFI-Werten, die für MAb anti-VASP-P ermittelt wurden abgezogen (Röhrcchen T1 oder T2).

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

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

### 9 TESTAUSWERTUNG

Der **Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI)** wird unter Verwendung der korrigierten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI<sub>c</sub>), die für PGE1 (PGE<sub>1</sub>) alleine oder in Anwesenheit von PGE1 und ADP (PGE<sub>1</sub>+ADP) getestet wurden, nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI)} = \frac{[\text{MFIc}_{\text{PGE1}} - \text{MFIc}_{(\text{PGE1} + \text{ADP})}] / \text{MFIc}_{\text{PGE1}} \times 100$$

Jedes Labor muss seine eigenen Auswertungswerte ermitteln, die für den zu bestimmenden P2Y12-Antagonisten spezifisch sind.

#### Behandlung mit Clopidogrel:

Mit dem **PLT VASP/P2Y12** (1)-Kit wurden inter-individuelle Variationen im Ansprechen auf eine Behandlung mit Clopidogrel nachgewiesen: Die PRI der Patienten (n = 33), die an einer ischämischen Herz-Gefäß-Krankheit litten und mehr als eine Woche lang mit Clopidogrel behandelt wurden, variierten von 6,6 bis 85,8 %.

Schlechtes Ansprechen auf Clopidogrel **85,8%** → **6,6%** Gutes Ansprechen auf Clopidogrel

Um die Effizienz eines P2Y12-Antagonisten wie etwa Clopidogrel zu messen, sind die folgenden Hinweise zu berücksichtigen:

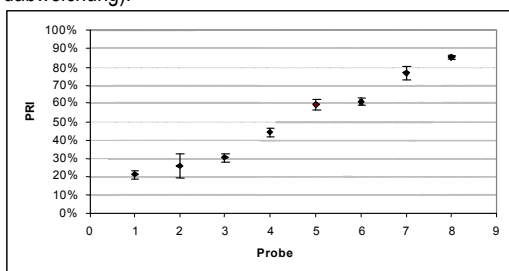
- Der Basalbereich der PRI-Werte (**ausgedrückt als Mittel +/- 2 Standardabweichungen**) ist für eine Patientengruppe mit entsprechender Krankheit, die den zu untersuchenden P2Y12-Antagonisten nicht erhält, zu bestimmen.
- Zur Information sei hier angemerkt, dass laut Veröffentlichung von Aleil B. *et al.* (1) der PRI der Patienten (n = 34), die an einer ischämischen Herz-Gefäß-Krankheit litten und nicht mit Clopidogrel behandelt wurden, 79,0 +/- 4,1 % betrug (ausgedrückt als Mittel +/- Standardabweichung).
- Vor der Behandlung ist der PRI-Basalwert des zu testenden Patienten (PRI<sub>0</sub>) zu bestimmen und zu prüfen, ob dieser Wert in den zuvor etablierten PRI-Basalbereich fällt. Ist das nicht der Fall, ist im Abschnitt Anwendungsgrenzen (§11) nachzulesen und der Test gegebenenfalls zu wiederholen.
- Bestimmung des PRI-Werts zu einem Zeitpunkt T (PRI<sub>T</sub>) unter Berücksichtigung der pharmakodynamischen Eigenschaften des zu bestimmenden P2Y12-Antagonisten. Wenn der PRI<sub>T</sub>-Wert immer noch innerhalb des PRI-Basalbereichs liegt, hat das Arzneimittel beim Patienten keine Wirkung gezeigt.

### 10 LEISTUNGEN

Der **PLT VASP/P2Y12**-Test wurde auf den Becton Dickinson-Geräten, Modell FACScalibur, und Beckman Coulter-Geräte, Modelle XL und XL MCL, validiert.

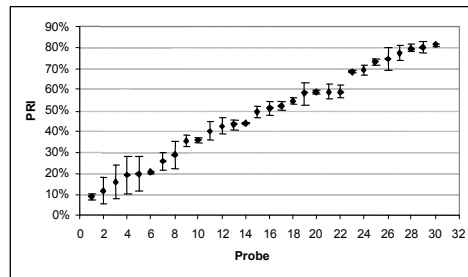
#### Wiederholbarkeit:

Proben (n = 8), die unterschiedlichen Antwortgraden (PRI) entsprechen, wurden 5 Mal mit demselben Kit getestet. Die Variationen sind unten dargestellt (Mittel +/- Standardabweichung):



#### Reproduzierbarkeit mit verschiedenen Chargen:

Proben (n = 30), die unterschiedlichen Antwortgraden (PRI) entsprechen, wurden mit 3 verschiedenen Kit Chargen getestet. Die Variationen sind unten in der Grafik dargestellt (Mittel +/- Standardabweichung):



#### Messbereich:

Der Messbereich für die Methode erstreckt sich von 0 bis 100 % PRI.

#### Interferenzen:

##### Aspirin:

Laut Veröffentlichung von Aleil B. *et al.* (1) führt Aspirin zu keiner signifikanten Interferenz beim **PLT VASP/P2Y12**-Test (n = 67): p = 0,328.

##### Thrombozyten-Zählung:

Bei nicht behandelten Proben, die 50 000 bis 300 000 Thrombozyten/µl Blut enthalten, hat die Thrombozyten Anzahl beim **PLT VASP/P2Y12**-Test zu keiner bedeutenden Interferenz geführt.

#### Korrelation mit der Aggregation:

Wie in der Veröffentlichung von Aleil B. *et al.* (1) beschrieben, besteht beim **PLT VASP/P2Y12**-Test eine enge Korrelation mit der Inhibierung der ADP-induzierten Plättchenaggregation aufgrund der spezifischen *in vitro* P2Y12 Inhibition: r = 0,72; p < 0,0001.

### 11 ANWENDUNGSGRENZEN

- Der **PLT VASP/P2Y12**-Kit kann nicht für hämolysierte Blutproben verwendet werden.

- Der **PLT VASP/P2Y12**-Kit sollte nicht für Proben verwendet werden, bei denen die gezählten roten Blutkörperchen die Untergrenze der normalen Werte unterschreiten. In diesem Fall wird empfohlen, den Test mit neuen Proben durchzuführen, die frühestens 24 Stunden später entnommen werden.

- Wenn die durchflusszytometrische Analyse unmittelbar nach Zugabe von 2 ml Reagens 1 am Ende des Protokolls durchgeführt wird, kann in manchen Proben eventuell eine unvollständige Auflösung der roten Blutkörperchen beobachtet werden. Dies wird durch ein Überlappen der Thrombozytenwolke und der Wolke der roten Blutkörperchen sichtbar.

Für eine vollständige Auflösung der roten Blutkörperchen ist die Probe in diesem Fall für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren, bevor die Röhrcchen mit dem Vortex-Mischer durchmischt werden. Anschließend ist die durchflusszytometrische Messung zu wiederholen.

### 12 HAFTUNG

Für die ordnungsgemäße Verwendung im Rahmen der *In-vitro*-Diagnostik sind die Anweisungen in der Anleitung strikt zu befolgen. Jede Modifizierung des Testprotokolls kann die Ergebnisse des Tests beeinflussen. Verwenden Sie nicht Reagenzien aus verschiedenen Chargen. In diesem Fall sind Reklamationen bzw. der Austausch des Produktes ausgeschlossen.

### 13 LITERATURHINWEISE

- ALEIL B. *et al.* (2005) *J Thromb Haemost* 3: 85-92.
- BARRAGAN P. *et al.* (2003) *Cathet Cardiovasc Intervent* 59: 295-302.
- GURBEL P.A. *et al.* (2003) *Circulation* 107: 2908-2913.
- MULLER I. *et al.* (2003) *Thromb Haemost* 89: 783-787.
- GEIGER J. *et al.* (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2007-2011.
- SCHWARZ U.R. *et al.* (1999) *Thromb Haemost* 82: 1145-1152.

### 14 RECHTE VORBEHALTEN

Der **PLT VASP/P2Y12**-Kit ist durch eine Lizenz für das Patent WO 99/24473 der Gesellschaft Vasopharm Biotech geschützt.

### 15 SYMBOLE

<b>REF</b>	Bestellnummer		Verwendbar bis
<b>IVD</b>	<i>In-Vitro-Diagnostikum</i>		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Temperaturbegrenzung	<b>LOT</b>	Chargenbezeichnung

BIOCYTEX  
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 August 2005