

ZYMUTEST PF4

Référence RK006A

Facteur plaquettaire 4 antigène
(Dosage ELISA du facteur plaquettaire 4)

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision : 17/11/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST PF4 est un dosage ELISA sandwich du facteur plaquettaire 4 humain, utilisable sur plasma pauvre en plaquettes ou tout autre milieu biologique où le PF4 doit être mesuré. Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

PRINCIPE :

Le dosage du PF4, avec le coffret ZYMUTEST PF4, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée avec des anticorps polyclonaux de lapin, purifiés par immuno-affinité, spécifiques du PF4, et stabilisée.

Le plasma ou l'échantillon dilué à tester est introduit dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Si le PF4 est présent, il se fixe sur l'anticorps immobilisé. Après lavage, le PF4 fixé sur la plaque est révélé par l'immunoconjugué, anticorps polyclonal de lapin purifié par immuno-affinité et couplé à la peroxydase (HRP), qui se lie aux épitopes libres du PF4. Après lavage, le substrat de la peroxydase, Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits de la plaque et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la coloration par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle au taux de PF4 humain présent dans le plasma ou dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant en présence d'inhibiteurs plaquettaires comme les tubes à prélèvement de type CTAD ou ETP.
- Tout milieu biologique où le PF4 doit être mesuré.

REACTIFS :

1. **COAT : Microplaque ELISA** (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée avec un anticorps polyclonal de lapin, purifié par affinité, et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons de 50 ml de **diluant échantillon** PF4, prêt à l'emploi, contenant un inhibiteur du facteur Rhumatoïde*.
3. **STD** : 3 flacons de **standard PF4 humain**, lyophilisé. Après reconstitution par 2 ml de diluant échantillon (SD), une solution contenant environ 10 UI**/ml (ng/ml) de PF4 humain est obtenue. Le titre du standard est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.
4. **CI** : 1 flacon de **0,5 ml de PF4 Contrôle I** (Haut) lyophilisé.
5. **CII** : 1 flacon de **0,5 ml de PF4 Contrôle II** (Bas) lyophilisé.
La concentration de PF4 des contrôles et les intervalles de confiance sont indiqués sur le papillon fourni dans le coffret.
6. **IC** : 3 flacons d'**immunoconjugué**, anticorps polyclonal de lapin, immuno-purifié, spécifique du PF4 et couplé à la peroxydase, lyophilisé.
7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de **diluant pour immunoconjugué**, prêt à l'emploi.
8. **WS** : 1 flacon de 50 ml de **solution de lavage**, 20 fois concentrée.
9. **TMB** : 1 flacon de 25 ml de substrat de la peroxydase: **3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine**, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
10. **SA** : 1 flacon contenant **6ml d'Acide Sulfurique 0,45M**, prêt à l'emploi (Stop solution).

Nota :

Utiliser uniquement les réactifs provenant de coffrets d'un même lot. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kits pour effectuer un dosage.

NOTA : *L'utilisation de l'inhibiteur du Facteur Rhumatoïde pour la préparation du diluant échantillon permet d'éviter l'interférence du facteur rhumatoïde, lorsqu'il est présent.
**UI : Unité Internationale

MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

- Pipettes à 8 canaux permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 µl.
- Pipettes à volume variable de 0 à 20 µl, de 20 à 200 µl et de 200 à 1000 µl.
- Laveuse pour microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.
- Eau distillée.

PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Dans leur emballage d'origine, avant toute utilisation et conservés à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

1. **Micro ELISA plate** : Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes de 8 puits nécessaire pour la série de dosages à effectuer. Les barrettes sorties du sachet aluminium doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à **4 semaines** dans leur emballage d'origine, hermétiquement refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à **2-8°C**, dans le sachet plastique minigrip fourni.
2. **PF4-Sample Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à **2-8°C**, pendant **4 semaines**, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient un inhibiteur du facteur Rhumatoïde et 0.05% de Kathon CG.
3. **PF4 Standard** : Chaque flacon doit être reconstitué avec **2 ml** de "PF4-Sample Diluent". Après reconstitution, ce flacon est stable au moins **8 heures** à température du laboratoire ou **24 heures à 2-8°C**.
4. **PF4 Control I (High)** : reconstituer avec 0,5 ml d'eau distillée.
5. **PF4 Control II (Low)** : reconstituer avec 0,5 ml d'eau distillée.

Nota : Après reconstitution, les PF4 contrôles I et II sont stables au moins **8 heures** à température du laboratoire, **24 heures à 2-8°C**, ou **2 mois** congelés à **-20°C** ou en dessous.

Précautions :

Le PF4 standard(3) et les contrôles (4&5) sont préparés à partir de plasmas humains. Ces derniers ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

6. **Anti-(h)-PF4-HRP immunoconjugué** : Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par **7,5 ml de "Conjugate Diluent"** au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. L'immunoconjugué reconstitué est stable au moins **24 heures** à la température du laboratoire ou **4 semaines à 2-8°C**.
7. **Conjugate Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à **2-8°C**, pendant **4 semaines**, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
8. **Wash Solution** : Incuber, si nécessaire, le flacon de solution de lavage dans un bain-marie à **37°C** jusqu'à totale dissolution des cristaux. Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au 1/20 en eau distillée. Les 50 ml de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution. Après ouverture, le flacon est stable **4 semaines à 2-8°C**, à l'abri de toute contamination. La solution de lavage diluée peut être utilisée jusqu'à **7 jours** après préparation, lorsqu'elle est protégée de toute contamination et conservée à **2-8°C**. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
9. **Substrat TMB** : Prêt à l'emploi. A utiliser dans un délai de **4 semaines** après ouverture, conservé à **2-8°C**, sous réserve de contamination bactériologique lors de l'utilisation.
10. **Solution d'arrêt** : Acide sulfurique 0,45M, prêt à l'emploi.

Nota :

- Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min avant le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

MODE OPERATOIRE :

Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être prélevé par ponction franche, sans garrot, sur du citrate trisodique 0.109 M contenant de la théophylline, de l'adénosine, et du dipyrindamole (tubes CTAD) (1 volume) et immédiatement placé dans de la glace pilée : prélever le tiers du surnageant plasmatique dans sa partie médiane après 30 minutes de centrifugation à 2-8°C à 2500 g ; le plasma doit être utilisé dans les 4 heures ou peut être conservé congelé, à -20°C ou moins, jusqu'à 6 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins 4 heures à température du laboratoire. Le plasma recueilli sur tube ETP (EDTA, théophylline, prostaglandine E1) peut également être utilisé.

Précautions :

Le plasma doit être correctement préparé et les précautions indiquées doivent être strictement observées afin d'éviter des concentrations faussement élevées de PF4 résultant de la présence résiduelle de plaquettes dans le surnageant ou de toute activation plaquettaire.

Plasma ou échantillon à tester et contrôles :

Le plasma ou l'échantillon à tester sont analysés dilués **au 1/2 ou au 1/5** dans le diluant échantillon (PF4-Sample Diluent). Pour des concentrations de PF4 > 50 ng/ml, diluer au **1/10 ou au 1/20 ou davantage** selon le cas.

Les contrôles I et II doivent être testés **dilués au 1/2**.

Gamme d'étalonnage :

En utilisant le standard PF4 (reconstitué par 2 ml) fourni dans le coffret, ayant un taux "C" de PF4- Ag, indiqué pour chaque lot de réactifs, sur le papillon inclus dans le coffret, préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration de PF4 (UI/ml)	C	C/2	C/5	C/10	C/20	0
Vol. de PF4 Standard à « C » UI/ml	1 ml	0.5 ml	0.20 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. de PF4-Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.80 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions d'étalonnages sont stables au moins **8 heures** à température du laboratoire.

Réalisation du dosage :

Sortir la quantité nécessaire de barrettes de 8 puits du sachet aluminium et les placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des microbarrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
PF4 Standard ou échantillon à doser	200 µl	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma dilué dans les puits
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages. (b)
Immunoconjugué Anti-PF4-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Introduire l'immunoconjugué dans les puits
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages. (b)
Substrat TMB / H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (b,c). <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire (18-25°C)		
Acide sulfurique 0.45 M	50 µl	Arrêter la réaction en introduisant 0.45M d'acide sulfurique. Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat (c).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. (d)		

Remarques :

- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour microplaques ELISA est possible. Bien respecter la température d'incubation (18-25°C). Si la température est trop forte (>25°C) ou trop faible (<18°C), les résultats sont affectés et les DO mesurées à 450 nm sont trop fortes ou trop faibles. En tenir compte pour l'analyse des résultats. De même, si un agitateur de plaques est utilisé, n'agiter qu'au début de chaque étape (dépôt échantillon, dépôt conjugué, solution d'arrêt), pendant 1 à 2 minutes, afin d'obtenir une bonne homogénéité. L'utilisation continue d'un agitateur augmente sensiblement les DO 450 obtenues dans le test.
- Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides entre l'addition des réactifs ou après les étapes de lavage, afin de préserver les protéines insolubilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque. Si nécessaire, garder les puits remplis de solution de lavage et les vider juste avant distribution du réactif suivant. Régler le laveur de manière à effectuer un lavage doux. Une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, peut endommager le coating et réduire la réactivité.
- Lors de la distribution du substrat TMB, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision. Il doit être le même lors de l'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique.

d) Pour une lecture bichromatique, le filtre 620 nm ou 690 nm peut être utilisé comme longueur d'onde de référence.

EXPRESSION DES RESULTATS :

Pour la mesure des concentrations de PF4, seule la courbe d'étalonnage effective obtenue pour la série de dosages réalisée doit être utilisée.

Sur du papier millimétré, porter en abscisses la concentration de **PF4, en UI/ml**, et en ordonnées les **DO 450** correspondantes.

Sur la courbe obtenue, en déduire la concentration de PF4 dans la dilution testée. Multiplier la valeur obtenue par le facteur de dilution (**2, 5, 10, 20, etc...** selon le cas) afin d'obtenir la concentration de PF4 dans l'échantillon testé.

Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc...) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de PF4.

Les résultats obtenus doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.

BIOCHIMIE DU PF4 :

Le PF4 est une protéine spécifique de la plaquette constituée de 70 acides aminés. Le poids moléculaire du tétramère de PF4 est d'environ 30 Kd. Il est libéré des granules α plaquettaires après activation, sous forme tétramérique, complexé à un protéoglycan plaquettaire (Réf. 1, 3,4). Sa demi-vie dans le plasma est courte (< 5 minutes) car le PF4 se fixe aux glycosaminoglycans des cellules endothéliales où il est stocké. Le PF4 a une très forte activité anti-héparine. Il forme un complexe stoechiométrique macro-moléculaire avec l'héparine, avec un optimum de 27 UI d'héparine par mg de PF4 (Réf. 2). La concentration de PF4 dans le plasma humain normal est habituellement inférieure à 10 UI/ml (Réf. 6).

STANDARDISATION :

Le standard PF4 de la trousse de dosage ZYMUTEST PF4 est calibré par rapport au premier standard international de PF4 (NIBSC, 83/505, 400 UI par ampoule) (Réf. 5). Une UI/ml de PF4 correspond environ à 1 ng/ml.

REACTIVITE DU DOSAGE :

La trousse ZYMUTEST PF4 mesure le facteur plaquettaire 4 de façon homogène quelle que soit sa présentation.

La présence d'héparine n'interfère pas dans le dosage.

REFERENCES :

- Hemodson M, Schmer G, Kurachi K. Isolation, crystallization, and primary amino acid sequence of human platelet factor 4. J Biol Chem 252 (18): 6276-6279; 1977.
- Lane DA, Denton J, Flynn AM, Thunberg L, Lindahl U. Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. Biochem J 218:725-732; 1984.
- Huang SS, Huang JS, Deuel TF. Proteoglycan carrier of human platelet factor 4. J Biol Chem 257: 115-46-11550: 1982.
- Zucker MB, Katz Jr. Platelet factor 4: production, structure and physiologic and immunologic action. In: proc Soc Exp Biol Med 198: 693-702; 1991.
- Kerry PJ, Curtis AD. Standardization of β -thromboglobulin (β -TG) and platelet factor 4 (PF4): a collaborative study to establish international standards for β -TG and PF4. Thromb Haemostasis 53: 51-55; 1985.
- Kaplan L, Owen J. Plasma levels of β -thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. Blood 87: 607-618; 1981.

Changement par rapport à la précédente version.