



ZYMUTEST Anti-Annexin V

IgG - Isotype

RK005A

Recherche et dosage des auto-anticorps Anti-Annexine V, d'isotype IgG

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière version : 20/10/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST anti-Annexin V, IgG, est une méthode ELISA sandwich pour la recherche et le dosage des auto-anticorps anti-Annexine V d'isotype IgG, utilisable sur plasma humain ou sérum.

Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

PRINCIPE :

La recherche des anticorps anti-Annexine V, avec le coffret ZYMUTEST anti-Annexin V, est réalisée à l'aide d'une plaque ELISA, sensibilisée par de l'Annexine V recombinant humaine, puis stabilisée.

Le plasma ou le sérum à tester sont introduits dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Les auto-anticorps anti-Annexine V d'isotype IgG, quand ils sont présents, se fixent sur l'Annexine V immobilisée. Après lavage, les anticorps ainsi fixés sont révélés par l'immunoconjugué, anticorps polyclonal de chèvre, spécifique du fragment F_cγ de l'IgG humaine, et couplé à la peroxydase (HRP). Cet immunoconjugué réagit spécifiquement avec l'auto-anticorps anti-Annexine V d'isotype IgG. Après lavage, le substrat, 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle à la quantité d'auto-anticorps anti-Annexine V, d'isotype IgG présente dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na₂ EDTA ou sérum.
- Tout autre liquide biologique où la recherche d'auto-anticorps anti-Annexine V, d'isotype IgG, doit être effectuée.

REACTIFS :

1. **COAT : Microplaque ELISA (Micro ELISA plate)**, contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée avec de l'Annexine V recombinante humaine, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD : Deux flacons de 50 ml de diluant échantillon** pour tests auto-immuns (**Autoimmunity Sample Diluent**), prêt à l'emploi. Contient de l'azide de sodium.
3. **CAL : Trois flacons de calibrateur** lyophilisés (**Anti-Annexin V, IgG calibrator**). A reconstituer par 1 ml de diluant échantillon, afin d'obtenir le contrôle positif prêt à l'emploi (**déjà dilué au 1/100**).
Ce calibrateur a une concentration définie en anticorps anti-Annexine V, exprimée en **Unités Arbitraires (UA)** et indiquée sur le papillon fourni dans le coffret.
4. **C- : Trois flacons de contrôle négatif (Negative control)**, lyophilisés, contenant du plasma humain normal dilué. Après reconstitution avec 1 ml de diluant échantillon, le contrôle négatif est prêt à l'emploi (**déjà dilué au 1/100**).
5. **IC : Trois flacons d'immunoconjugué (Anti-IgG (F_cγ)-HRP immunoconjugate)**, anticorps polyclonal de chèvre, spécifique de la partie F_cγ de l'IgG humaine, couplé à la peroxydase et lyophilisé.
6. **CD : 1 flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué (Conjugate Diluent)**, prêt à l'emploi.
7. **WS : 1 flacon de 50 ml de solution de lavage (Wash Solution)**, 20 fois concentrée.
8. **TMB : Un flacon de 25 ml de substrat : 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB)**, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
9. **SA : Un flacon de 6ml d'acide sulfurique 0.45M (Stop Solution) (SA)**, prêt à l'emploi.

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.

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
- Matériel de lavage 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. **Autoimmunity 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.
3. **Calibrator :** Chaque flacon doit être reconstitué avec 1 ml de "Autoimmunity-Sample-Diluent". Le calibrateur ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma contenant des auto-anticorps anti-Annexine V, d'isotype IgG, déjà dilué au 1/100. Après reconstitution, ce flacon peut être conservé à 2-8°C, pendant 5 jours, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
4. **Negative control :** Chaque flacon doit être reconstitué avec 1 ml de "Autoimmunity-Sample-Diluent". Le contrôle négatif ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma négatif déjà dilué au 1/100. Après reconstitution, ce flacon peut être conservé à 2-8°C, pendant 2 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.

Précautions : Le contrôle négatif est préparé avec des 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.

5. **Anti-IgG (F_cγ)-HRP immunoconjugate :** 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 et 4 semaines à 2-8°C.
6. **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.
7. **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. La solution de lavage concentrée contient 0.05% de Kathon CG.
8. **TMB substrate :** Substrat TMB 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.
9. **Stop solution :** Solution contenant 0.45M d'acide sulfurique, prête à l'emploi.

Nota : Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min. avant de réaliser le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.

MODE OPERATOIRE :

Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109 M (1 volume) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé dans les 24 heures ou conservé congelé, à -20°C au moins, pendant 6 mois maximum. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins 12 heures à température du laboratoire.

L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur Na₂ EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

L'utilisation de sérum est possible pour la recherche des auto-anticorps anti-Annexin V. Il est toutefois préférable d'effectuer les dosages sur plasma.

Plasma ou échantillon à tester :

Le plasma ou le sérum à tester sont analysés dilués au 1/100 dans le diluant échantillon (Autoimmunity Sample Diluent). En présence d'échantillons avec un taux très élevé d'anticorps anti-Annexin V, diluer au 1/200 ou au 1/400. Les résultats obtenus devront alors être multipliés par 2 ou 4.

Le calibrateur et le contrôle négatif sont prêts à l'emploi et correspondent à des plasmas déjà dilués au 1/100.

Réalisation du dosage :

Courbe de calibration : Une courbe de calibration peut être obtenue à partir du calibrateur (CAL) inclus dans le coffret. La concentration (C) est donnée en Unités Arbitraires, (UA) et indiquée sur le papillon fourni dans le kit. Préparer les solutions standards en effectuant une série de dilutions de rythme 2 du calibrateur (gamme allant de C/1 à C/32) en diluant échantillon (Autoimmunity Sample Diluent).

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 micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
Calibrateur Anti-Annexin V IgG ou contrôle négatif ou échantillons dilués au 1:100 ou Diluant échantillon (blanc)	200 µl	Introduire les dilutions: – calibrateur ou – contrôle négatif ou – Echantillons dilués ou – Diluant échantillon dans les puits de la plaque.
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (a) (b)		
Solution de lavage (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages. (a)
Immunoconjugué anti-IgG (Fc γ)-HRP, reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Immédiatement après le lavage, Introduire l'immunoconjugué dans les puits.
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (a)		
Solution de lavage (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages. (a)
Substrat TMB/H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement après lavage, introduire cette solution dans les puits. <i>Nota :</i> la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément. (c)
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire (b)		
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. Soustraire les blancs (d).		

Nota :

- 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 microplaque ELISA est possible.
- 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.
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620nm ou à 690nm.

VALIDATION :

- Le calibrateur et le contrôle négatif fournis dans le coffret, permettent de valider la bonne réalisation du dosage.
- Les DO attendues pour le calibrateur et le contrôle négatif peuvent varier de lot à lot mais, lorsque le dosage est réalisé à température du laboratoire, entre 18 et 25°C, ces DO sont toujours de :

P = DO₄₅₀ pour Calibrateur 1/1 : ≥ 1.5

N = DO₄₅₀ pour Contrôle Négatif : ≤ 0.25

Les valeurs obtenues pour P et N, à 18-25°C, sont indiquées pour chaque lot de réactif dans le papillon inclus dans le coffret.

EXPRESSION DES RESULTATS :

- Les résultats sont exprimés à l'aide des DO 450 obtenues pour la gamme d'étalonnage. Les contrôles et les taux sont déterminés à l'aide de la courbe de calibration.
- Sur papier millimétré, porter les concentrations d'anti-Annexine V exprimées en UA sur l'axe des abscisses et les DO correspondantes en ordonnées (voir modèle sur le papillon). La concentration d'anti-Annexine V, d'isotype IgG, pour l'échantillon testé, à la dilution standard 1:100, et exprimée en UA, est directement déduite de la courbe d'étalonnage.
- Pour des dilutions plus importantes, (ex : D), la concentration mesurée doit être multipliée par le facteur de dilution complémentaire (soit D:100 ; par exemple x2 for 1:200 ou x4 pour 1:400).
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc.) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

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.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Une courbe de calibration est utilisée pour calibrer le test, en utilisant une gamme de dilution de rythme 2. Ceci permet d'obtenir une meilleure reproductibilité et fiabilité du test, et une meilleure précision des mesures de lot à lot, ainsi qu'une meilleure définition de la valeur seuil.

Zone négative: Les unités arbitraires (UA) du calibrateur, sont définies par rapport à la limite supérieure de la zone normale, qui correspond à la valeur moyenne obtenue sur les plasmas normaux majorée de 2 écart types (SD). Par définition, cette valeur correspond à 10 UA. Ainsi, les valeurs normales sont :

Zone négative : < 10 UA/ml

Zone douteuse: Zone douteuse : ≥ 10 UA/ml et < 20 UA/ml

Zone positive: La zone positive est définie pour les concentrations suivantes d'autoanticorps anti-Annexine V :

Zone positive : ≥ 20 UA/ml

La positivité peut être classée de la façon suivante:

Faible positivité: ≥ 20 à < 50 UA/ml

Positivité modérée : ≥ 50 à < 100 UA/ml

Forte positivité : ≥ 100 UA/ml

LIMITES DE LA METHODE :

Un lavage insuffisant de la plaque peut se traduire par un "bruit de fond" élevé et une valeur trop forte du contrôle négatif. Vérifier que le lavage est efficace et correctement effectué. Ce test est une méthode de recherche, pour un usage expérimental.

SPECIFICITE ET CARACTERISTIQUES DU TEST :

Le coffret ZYMUTEST anti-Annexin V, IgG, mesure spécifiquement la présence d'auto anticorps anti-Annexine V, d'isotype IgG. Les isotypes IgM ou IgA ne sont pas dosés. Ce dosage est réalisé en utilisant de l'Annexine V recombinante humaine, hautement purifiée. Cette approche permet d'obtenir un dosage offrant une grande reproductibilité, une grande sensibilité et une excellente spécificité.