

ZYMUTEST Annexin V

Référence RK004A

Annexine V antigène

(Dosage ELISA de l'Annexine V)

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision : 17/11/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST Annexin V est un dosage ELISA sandwich de l'annexine V, utilisable sur plasma humain ou tout autre milieu biologique où l'annexine V est recherchée. **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 de l'annexine V, avec le coffret ZYMUTEST Annexin V, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée avec les fragments F(ab')₂* d'un anticorps de lapin purifié par immuno-affinité, spécifique de l'annexine V, et stabilisée.

Le plasma ou l'échantillon à tester sont introduits dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Si l'annexine V est présente, elle se fixe sur l'anticorps immobilisé. Après lavage, l'annexine V fixée sur la plaque est révélée par l'immunoconjugué, anticorps polyclonal de lapin purifié par immuno-affinité et couplé à la peroxydase (HRP), qui se fixe sur les épitopes libres de l'annexine V. Après lavage, le substrat, 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 d'annexine V présente dans le plasma ou dans l'échantillon testé.

Nota * : L'utilisation de fragments F(ab')₂ anti-Annexine V pour les plaques pré-coatées permet d'éviter l'interférence éventuelle liée au facteur rhumatoïde.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na₂ EDTA.
- Tout milieu biologique où l'annexine V doit être mesurée.
- Contrôle de qualité des concentrés plaquetaires ou de cellules sanguines afin d'évaluer la lésion cellulaire due au stockage, par la mesure de l'Annexine V libérée dans le surnageant.

REACTIFS :

1. **COAT** : Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée avec les F(ab')₂* d'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 (Sample Diluent), prêt à l'emploi.
3. **Std** : 3 flacons de standard d'Annexine V humaine (recombinante), lyophilisée (Annexin V Standard). Après reconstitution par 2 ml de diluant échantillon (Sample Diluent), une solution titrée à « C » ng/ml d'Annexin V est obtenue. Le titre de la solution standard est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret, usuellement environ 10 ng/ml.
4. **CI** : 1 flacon de 1 ml de Plasma Control I (UTA, haut), lyophilisé (plasma humain).
5. **CII** : 1 flacon de 1 ml de Plasma Control II (UTA, bas), lyophilisé (plasma humain). La concentration d'Annexine V et les intervalles de confiance sont indiqués sur le papillon fourni dans le coffret.
6. **IC** : 3 flacons d'immunoconjugué (Anti-Annexin V-HRP immunoconjugate), anticorps polyclonal de lapin, immuno-purifié, spécifique de l'annexine V et couplé à la peroxydase, lyophilisé.
7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué (Conjugate Diluent), prêt à l'emploi.
8. **WS** : 1 flacon de 50 ml de solution de lavage (Wash Solution), 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 6 ml d'Acide Sulfurique 0,45 M (Stop Solution), 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 minigrp fourni.
2. **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 0.05% de Kathon CG.
3. **Annexine V Standard** : Chaque flacon doit être reconstitué avec 2 ml de "Sample Diluent". Après reconstitution, ce flacon est stable au moins 4 heures à température du laboratoire.
4. **Plasma Control I lyophilisé (UTA, high)** : reconstituer avec 1 ml d'eau distillée.
5. **Plasma Control II lyophilisé (UTA, low)** : reconstituer avec 1 ml d'eau distillée.

Nota : Après reconstitution, les 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 : Les contrôles 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-Annexine V-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.
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 0,45 M, 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 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 4 heures ou conservé congelé, à -20°C au 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.

L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur Na_2EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté. L'utilisation de Na_2EDTA comme anticoagulant ou l'addition de 0,025 M de Na_2EDTA (à pH 7,5) au prélèvement sanguin citraté, avant préparation du plasma, permet un meilleur recouvrement de l'Annexine V, protéine calcium dépendante, dans le plasma (Réf. 6).

Plasma ou échantillon à tester :

Le plasma ou l'échantillon à tester sont analysés **dilués au 1/2** dans le diluant échantillon (Sample-Diluent). Pour des concentrations d'annexine V > 20 ng/ml, diluer au **1/5** ou 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 d'Annexine V (recombinante, humaine) fourni dans le coffret, et ayant un taux "C" ng/ml d'Annexine V, 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 d'Annexine V (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. d'Annexine V Std à « C » ng/ml	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,1 ml	0,05 ml	0 ml
Vol. de Sample Diluent	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	0,9 ml	0,95 ml	1 ml

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions d'étalonnages sont stables au moins **4 heures** à température du laboratoire.

REALISATION 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
Annexine V standard ou échantillon à doser ou contrôles	200 μl	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma dilué dans les puits (a)
Incuber 1 heure à température du laboratoire ($18-25^{\circ}\text{C}$) (b)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 μl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (c).
Immunoconjugué Anti-Annexine V-HRP (reconstitué par 7,5 ml de diluant pour immunoconjugué)	200 μl	Introduire l'immunoconjugué dans les puits (c)
Incuber 1 heure à température du laboratoire ($18-25^{\circ}\text{C}$) (b)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 μl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (c).
Substrat TMB / H_2O_2	200 μl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (c, d). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer pendant 5 min. à température du laboratoire ($18-25^{\circ}\text{C}$) (b)		
Acide sulfurique 0,45 M	50 μl	Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat.
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm (e).		

Remarques :

- Les dilutions au 1/2 peuvent être réalisées directement dans les puits de la plaque en introduisant 100 μl de Sample Diluent et 100 μl de plasma à tester ou de contrôle. Effectuer rapidement les dépôts de calibrateurs, contrôles et tests sur la microplaque (≤ 10 min.) afin d'obtenir une cinétique immunologique homogène pour l'immunocapture.
- 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 micro-plaques ELISA est possible. Bien respecter la température d'incubation ($18-25^{\circ}\text{C}$). Si la température est trop forte ($>25^{\circ}\text{C}$) ou trop faible ($<18^{\circ}\text{C}$), 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.

d) 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.

e) 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 d'annexine V, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée (voir papillon).

– Sur du papier millimétré, porter en abscisses la concentration d'Annexine V, en ng/ml, et en ordonnées les DO 450 correspondantes.

– Sur la courbe obtenue, en déduire la concentration d'Annexine V 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 d'Annexine V dans l'échantillon testé.

Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc..) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration d'Annexine V.

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.

VALEURS NORMALES :

La concentration d'Annexine V dans le plasma humain normal est habituellement inférieure à 10 ng/ml (Réf. 3).

REACTIVITE DU TEST :

Le test ZYMUTEST Annexine V mesure l'annexine V recombinante ou native.

BIOCHIMIE DE L'ANNEXINE V :

L'annexine V est une protéine calcium-dépendante de 35KD, présente dans de nombreux tissus et principalement dans les cellules endothéliales et celles du placenta. Elle est présente en faible concentration dans les plaquettes et à plus forte concentration dans les globules rouges et les leucocytes. Elle se lie aux phospholipides anioniques et aux membranes cellulaires activées de façon calcium-dépendante (ref 1,2).

Elle inhibe les activités pro-coagulante et pro-inflammatoire des cellules apoptotiques (ref 4). La concentration d'Annexine V dans le plasma humain normal est habituellement inférieure à 10 ng/ml (Réf. 3)

REFERENCES:

- Olofsson A, Mallouh V, Brisson A. Two-dimensional structure of membrane-bound Annexin V at 8 Å resolution. J Struct Biol 1994; 113: 199-205.
- van Heerde WL, Poort S, vanT Veer C, Reutelingsperger CPM, de Groot PG. Binding of recombinant annexin V to endothelial cells: effect of annexin V binding on endothelial-cell-mediated thrombin formation. Biochem J 1994; 302: 305-312.
- Krailadsiry P, Seghatchian J, Amiral J, Vissac AM, Contreras M. Annexin V, a new marker of platelet storage lesion: correlation with dMPV. Transfus Sci 1997; 2: 223-226.
- Reutelingsperger CPM, van Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. Cell Mol Life Sci 1997; 53: 527-532.
- Van Heerde W.: Annexin V - Thèse Rijksuniversiteit Limburg – Maastricht (The Netherlands) 1994.

Changement par rapport à la précédente version.