Immunologie : technique de Mancini

Réf. MANCINI

A RECEPTION DU COLIS :

☑ **Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous

☑ 🌡 **Stocker**

Le sachet **AI** à -20°C

Le tube de PBS 10X à 4°C

Le reste à température ambiante.

☑ **Durée de conservation : 3 mois**

☑ **Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité**

COMPOSITION

Pour 20 binômes : 20 boites de tests et 10 boites d'entrainement
- 30 boites de pétri diam 5,5 cm
- 30 poires emporte-pièces
- 2 g d'agarose
- 2 tubes de 1 ml d'anticorps anti-BSA (micro tube à bouchon rouge)
- 2 tubes de BSA (micro tube à bouchon blanc)
- 1 tube de 30 ml de PBS 10X (Tube conique à bouchon vert)
- 20 tubes 7 ml (ref : TBC)
- 3 micro-tubes avec bouchons
- Notice technique et pédagogique

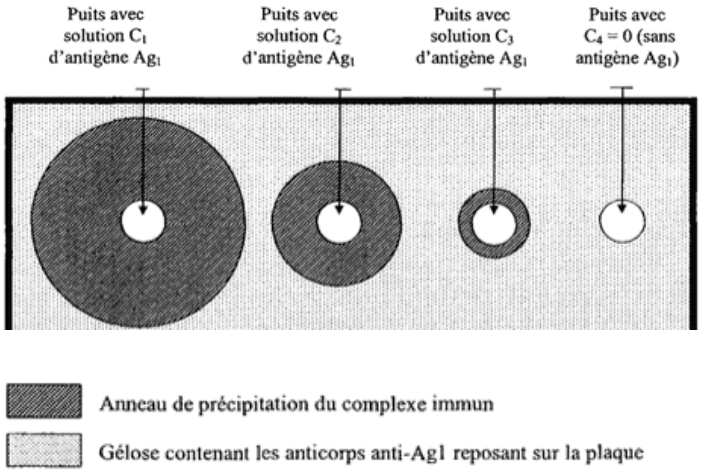
MATERIEL NECESSAIRE

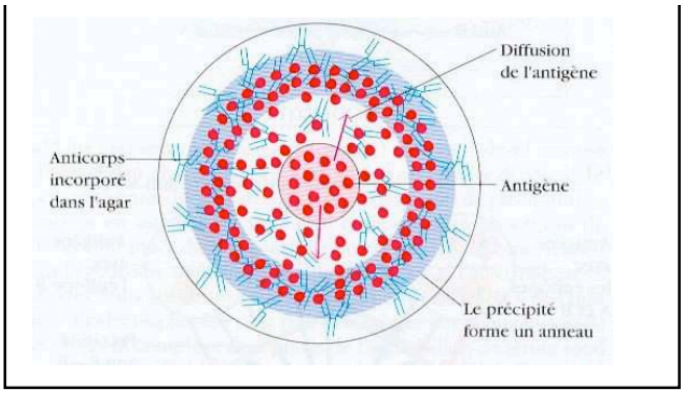
Matériel nécessaire :
- Micropipette à volume variable 1-10 µL
- Cônes pour micropipette 10 µL
- Erlenmeyer 250 ml
- Microtubes
- Micro-onde ou plaque chauffante
- Enceinte humide
- Boite et papier absorbant pour constituer une enceinte humide
- Eau distillée
- règle graduée pour la mesure

OBJECTIFS COGNITIFS

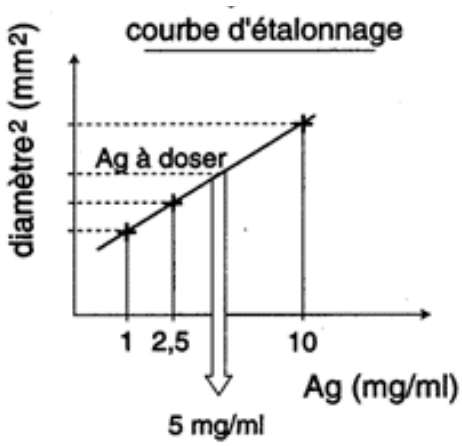
Définition et vocabulaire :

La technique de Mancini ou test d'immunodiffusion radiale simple repose sur la formation de complexes immuns (complexe spécifique antigène-anticorps) en utilisant une plaque recouverte d'une gélose à hauteur constante dans laquelle est mélangé un sérum contenant des anticorps anti-antigène Ag1.
L'utilisation de gélose permet une migration rapide des molécules antigéniques depuis les puits = zone de dépôts vers toutes les directions de l'espace. La présence de complexes immuns se matérialise par l'apparition d'une auréole de précipitations dont le diamètre dépend de la concentration de l'antigène retrouvé chez l'individu.
Cette technique a été proposée par Mancini pour doser certains antigènes. Il suffit en effet de faire un calibrage en utilisant des quantités connues d'antigène purifié.
Les solutions de concentrations décroissantes (C1, C2, C3 etC4) et connues d'antigène Ag1 sont placées dans les puits creusés dans la gélose. Les antigènes diffusent dans la gélose.





A partir de ces concentrations connues et du diamètre extérieur de l'anneau de précipitation, on construit une courbe gamme étalon selon le modèle ci-dessous qui permettra de déduire les concentrations en antigènes contenu dans l'échantillon à tester.



C'est donc un test qualitatif et quantitatif.
Un test d'immunodiffusion radiale inverse, dans lequel l'antigène est incorporé dans la gélose et les anticorps dans les puits, peut être utilisé pour quantifier la quantité d'anticorps dans un échantillon.

Contexte d'utilisation du test de MANCINI :
La méningite tuberculeuse (TBM) est encore une cause sérieuse de morbidité et de mortalité dans les pays en développement, et le calendrier de traitement est le facteur le plus crucial qui affecte le résultat final. Pour établir un diagnostic rapide, le test de MANCINI est utilisé pour détecter l'antigène circulant de mycobactérie dans le LCR de patients avec suspicion clinique de TBM.

Le test de Mancini est la plus simple des techniques immunologiques pour la détermination quantitative de l'antigène ou de l'anticorps. Le liquide céphalorachidien est recueilli par ponction lombaire. C'est lui qui contient les antigènes à doser. Il n'y a qu'à le déposer dans les puits de la lame gélosée et à attendre la réaction contrairement au test Elisa qui nécessite plusieurs étapes de manipulation successives.

Intérêt pédagogique :
L'intérêt général de la manipulation est de montrer que l'on peut non seulement détecter mais aussi doser un antigène dans une solution. Il permet aussi d'aborder la notion de gamme étalon et de la faire construire aux élèves à l'aide d'un tableur directement à partir de leurs données expérimentales.
Ce TP se déroule donc en 2 séances :

- une première séance où les boites sont coulées et les dépôts effectués ;
- une deuxième séance pendant laquelle les résultats sont lus, la gamme étalon est réalisée avec un tableur, la concentration inconnue est déterminée.

But du test de MANCINI que nous proposons:
Le test consiste à doser un antigène de BSA en utilisant une lame gélosée contenant des anticorps spécifiques de cet antigène.
Nous conseillons par ailleurs de proposer aux élèves de s'entrainer à percer les puits sur des boites gélosée ne contenant pas d'anticorps de façon à limiter les risques d'échec sur les boites les plus coûteuses.
Il peut être par ailleurs proposé aux élèves de couler eux-mêmes les boites, c'est un geste technique simple à effectuer.

FICHE PREPARATEUR

A. Préparation des boîtes :

1. Préparation du tampon PBS :
Dans un Erlenmeyer de 300ml, ajouter 270ml d'eau déminéralisée au 30 ml de tampon PBS fourni. Obtention de 300 ml de PBS 1X.

2. Préparation de la gélose à 2% d'agarose :
Si les boites sont réalisées par les élèves

Dans un Erlenmeyer de 250 ml mettre 100 ml de tampon 1X préalablement préparé.

- Ajouter les 2g d'agarose fournis (obtention d'une gélose à 2%)
- Fermer l'Erlenmeyer avec un aluminium (pour limiter l'évaporation lors du chauffage)
- Portez à ébullition quelques secondes pour dissoudre l'agarose.
- Si l'évaporation est trop importante, réajuster le volume avec de l'eau déminéralisée.

Faire chauffer 100ml de tampon PBS 1X à environ 70°C (l'ébullition ne détériore pas le tampon)
Dans le tube à bouchon blanc de 7 ml fourni introduire :

- 2.5 ml de PBS 1X chaud (environ 65°C)
- puis 100µL d'Ac Anti BSA
- puis 2.5 ml de la gélose à 2% d'agarose chaude
- fermer le tube
- mélanger par 3 ou 4 retournements
- couler immédiatement dans la boite de pétri de diam 5,5 cm fournie
- laisser refroidir

Les boites peuvent être coulées la veille et conservées au réfrigérateur à 4°C.

Le reste de la gélose et du tampon servent à faire des boites d'entrainements (mélanger à volume égal) pour que les élèves s'entrainent à faire les puits et les dépôts.

Si les boites doivent êtres préparées en une seule fois par un préparateur on peut réaliser la gélose de la façon suivante :
Dans un Erlenmeyer de 300ml mettre 200ml de tampon PBS 1X

- Ajouter les 2g d'agarose fournis
- Fermer l'Erlenmeyer avec un aluminium (pour limiter l'évaporation lors du chauffage)
- Portez à ébullition quelques secondes pour dissoudre l'agarose.
- Si l'évaporation est trop importante, réajuster le volume avec de l'eau déminéralisée.

Prendre 100ml de gélose refroidie à environ 65°C ajouter les 2ml d'AC (la gélose ainsi préparée ne pourra pas être réchauffée cela détériorait l'AC) et couler les 20 boites tests.
Le reste de gélose peut être utilisé pour faire des boites d'entrainements pour que les élèves s'entrainent à faire les puits et les dépôts.

Les boites peuvent être coulées la veille et conservées au réfrigérateur à 4°C.

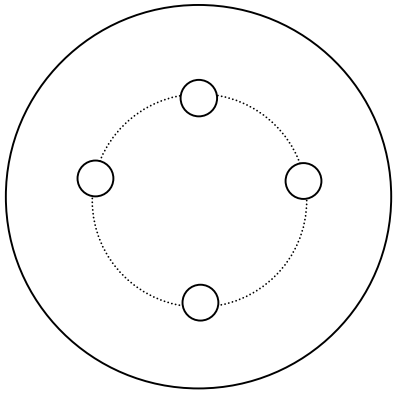
3. Préparation des solutions d'Ag

La solution à 2.5 mg/ml est fournie (solution mère) faire une dilution au ½ ; une au ¼ et une au 1/5 dans du tampon PBS 1X (utiliser les 3 µtubes fournis pour les stocker) vous obtiendrez 4 solutions à :
2.5 mg/ ml ; 1.25 mg/ ml ; 0.625 mg/ ml ; et 1 mg/ ml
En choisir 3 comme étalon, et une comme inconnue.

MANIPULATION

B. Préparation du modèle pour la réalisation des puits :

Photocopier le modèle ci dessous ou dessiner un modèle de réalisation des puits dans les boîtes de gélose en suivant les instructions ci-dessous :



👁👁 ATTENTION 👁👁 : respectez le modèle de réalisation des puits car les distances sont étudiées pour fournir de bons résultats.

C. Réalisation des puits dans la boîte de gélose :

Poser la boite gélosée sur le modèle de perçage fourni dans cette notice (couvercle vers le haut)
Ouvrir la boîte
Faire un trou en perçant la gélose avec la poire fournie, puis les 3 trous suivants en respectant le schéma fourni.
REMARQUE : Pensez à garder des boîtes sans puits pour fournir aux élèves en secours.

🗝 Conseils 🗝 : Le disque de gélose formé par la poire à pipeter (=l'emporte-pièce) est enlevé en relâchant la pression sur la poire à pipeter, ce qui provoque une légère aspiration.

👁👁 ATTENTION 👁👁 à ne pas fendre la gélose.

D. Dépôts des solutions (micropipette OBLIGATOIRE) :

Déposer 7µL de chacune des 3 solutions connues et de la solution inconnue dans les puits.
Donner une orientation à la boîte en faisant un trait au stylo permanent sur la boîte au niveau d'un puits
Repérer sur un dessin le plan des dépôts de solutions

👁👁 ATTENTION 👁👁 : ne pas mélanger les cônes pour prélever les solutions ; chaque microtube a son cône attitré.

E. Obtention des résultats :

Placer les boîtes à température constante relativement chaude (26 °C minimum conseillés) pendant 48H, dans une enceinte humidificatrice (papier absorbant humide dans une enceinte fermée).
Une fois les résultats obtenus, installer les boîtes dans une enceinte humidificatrice (papier absorbant humide dans une enceinte fermée) au réfrigérateur.

F. Lecture des résultats :

Au bout de 48 heures, un disque apparaît autour des puits. Il faut en mesurer le diamètre.
Ces discs doivent absolument être mesurés au bout de 48H car ils sont assez difficiles à distinguer, et peuvent s'estomper rapidement.

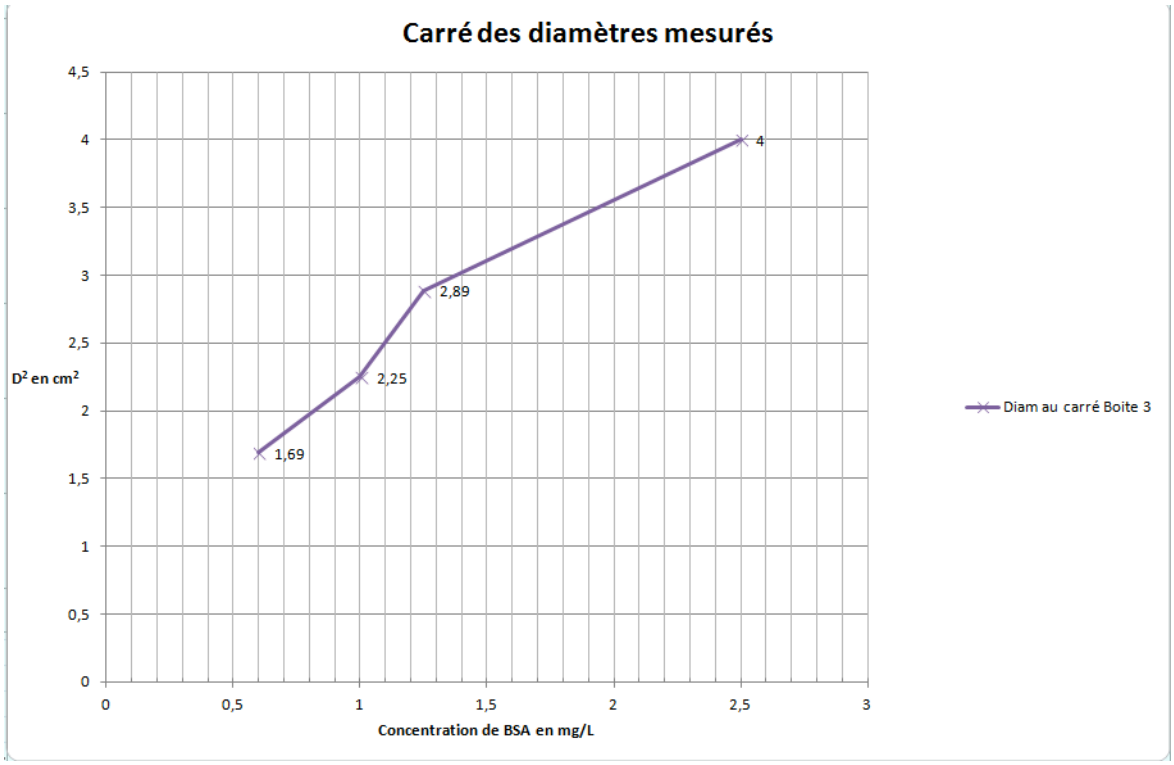
Pour bien les observer, regarder au travers de la boîte, sur fond noir et avec une illumination oblique

Tracer la courbe D^2 en fonction de la concentration en BSA

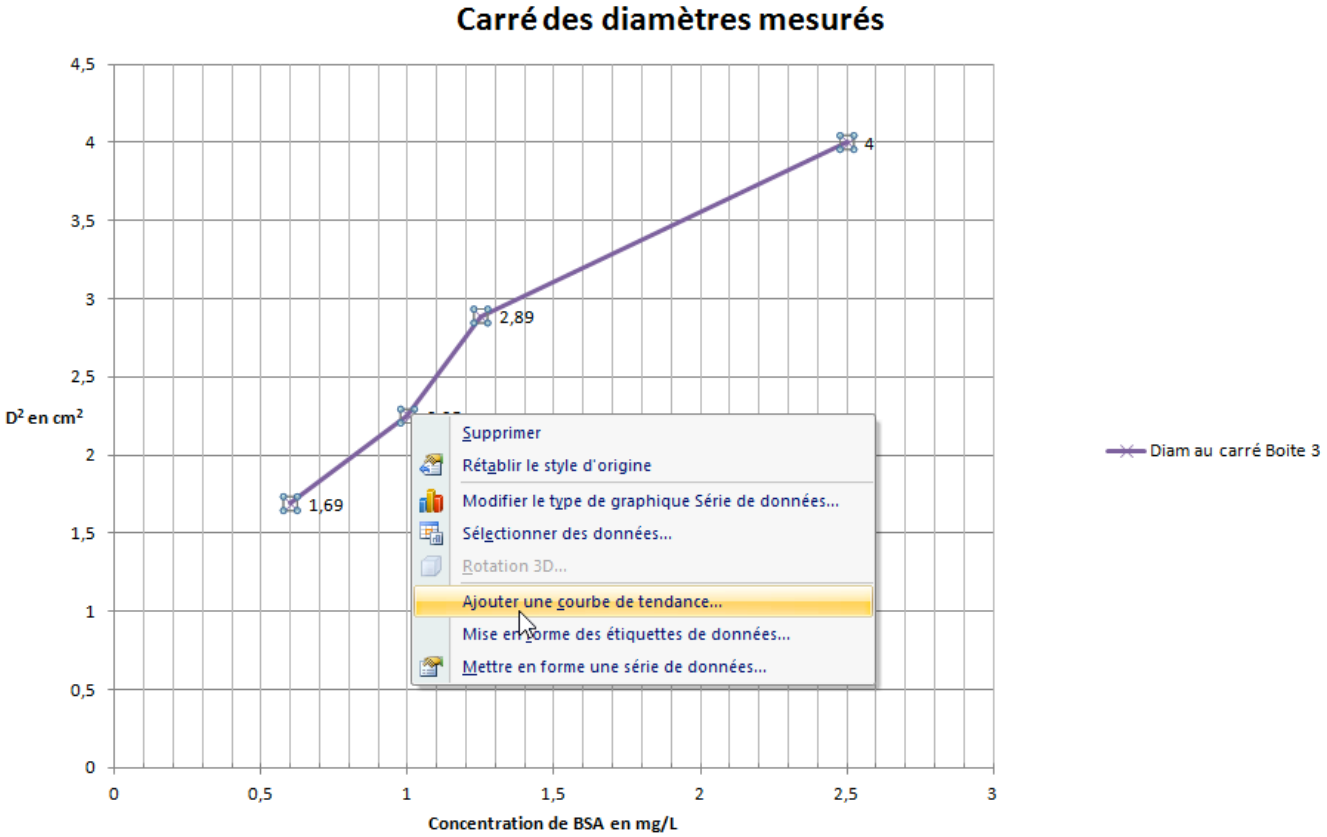
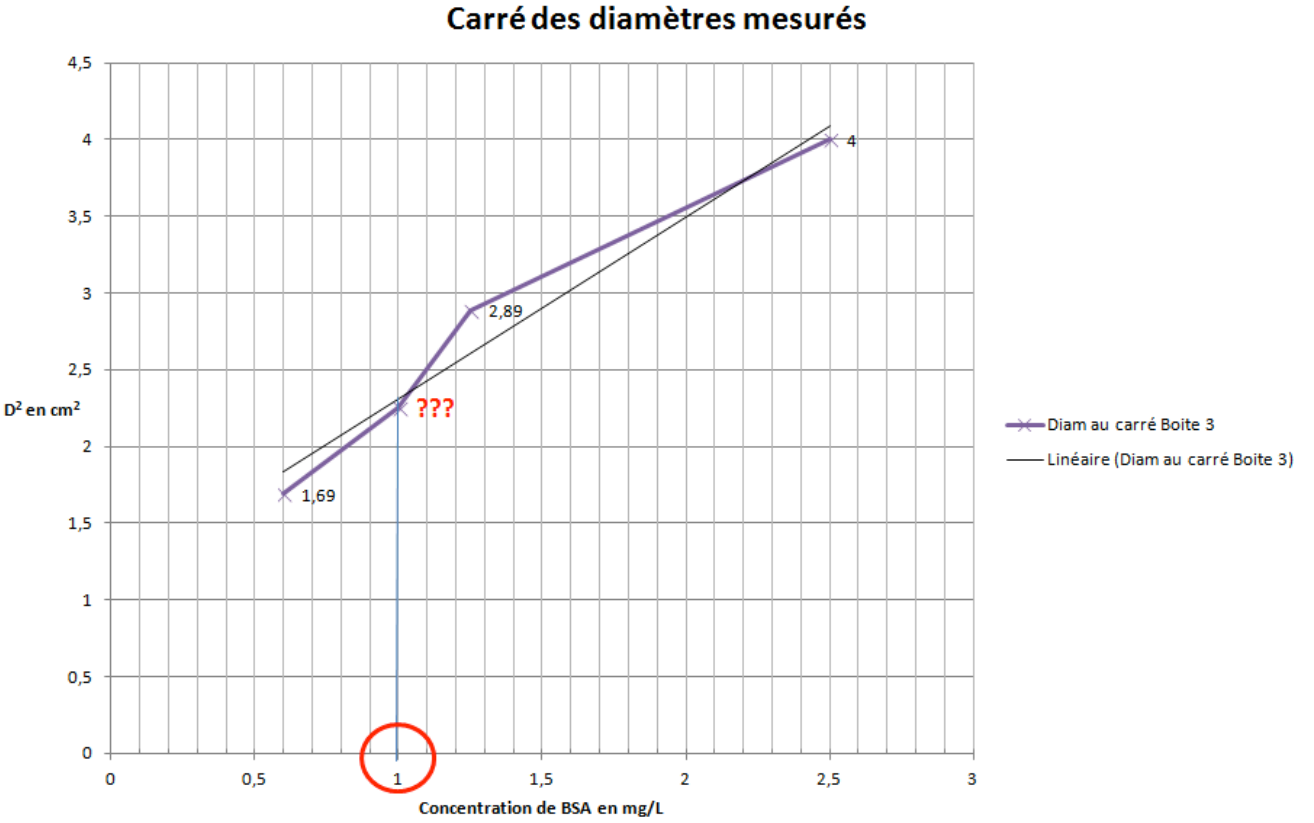
RESULTATS ET INTERPRETATION

	Diamètres mesurés en cm				Diam au carré en cm^2		
[BSA]mg/L	**Boite 1**	**Boite 2**	**Boite 3**	**[BSA]mg/L**	**Boite 1**	**Boite 2**	**Boite 3**
0,6	1,4	1,4	1,4	**0,6**	1,96	1,96	1,69
1	1,5	1,5	1,5	**1**	2,25	2,25	2,25
1,25	1,6	1,6	1,7	**1,25**	2,56	2,56	2,89
2,5	2	2	2	**2,5**	4	4	4

A l'aide d'un tableur, l'élève doit tracer la courbe des carrés des diamètres mesurés en fonction de la concentration de BSA.



Puis il doit ajouter une courbe de tendance linéaire



Il peut alors retrouver la concentration inconnue.