

Kit Mancini de substitution

Réf. MANCINISUB

A RECEPTION DU COLIS :

Vérifier la composition du colis indiquée ci-dessous

↓ Stocker

La totalité du kit se conserve à température ambiante.

Durée de conservation : 12 mois

Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité

COMPOSITION

Pour 20 binômes : 20 boîtes de tests et 10 boîtes d'entraînement

- 30 boîtes de pétri diam 5,5 cm
- 30 poires emporte-pièces
- 3g d'agar
- un flacon de 175 ml d'eau
- un tube de 35 ml d'eau basique
- 1 tube de 1ml de sulfate de zinc simulant les antigènes (micro tube à bouchon vert)
- 3 micro-tubes avec bouchons
- Notice technique et pédagogique

MATERIEL NECESSAIRE

Matériel nécessaire :

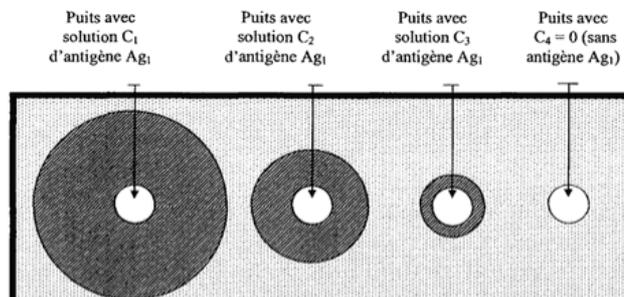
- Micropipette à volume variable 1-10 µL
- Cônes pour micropipette 10 µL
- Erlenmeyer 250 ml
- Microtubes
- Micro-onde ou plaque chauffante
- Enceinte humide
- Boîte et papier absorbant pour constituer une enceinte humide
- Eau distillée
- règle graduée pour la mesure

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.

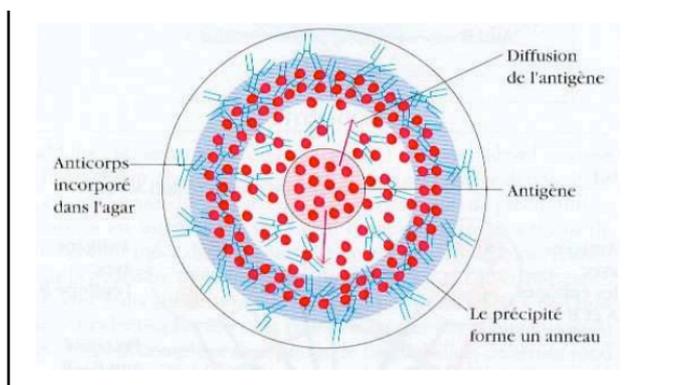
Cette technique a été proposée par Mancini pour doser certains antigènes. Il suffit en effet de faire un calibrage en utilisant des quantités connues d'antigène purifié. Les solutions de concentrations décroissantes (C1, C2, C3 et C4) et connues d'antigène Ag1 sont placées dans les puits creusés dans la gélose. Les antigènes diffusent dans la gélose.



■ Anneau de précipitation du complexe immun
 ■ Gélose contenant les anticorps anti-Ag1 reposant sur la plaque

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.

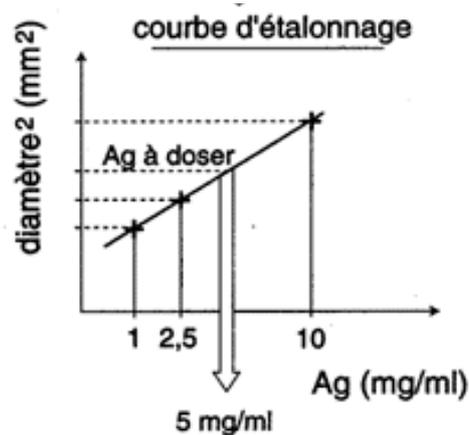
Le test de Mancini est la plus simple des techniques immunologiques pour la détermination quantitative de l'antigène ou de l'anticorps. Le liquide céphalorachidien est recueilli par ponction lombaire. C'est lui qui contient les antigènes à doser. Il n'y a qu'à le déposer dans les puits de la lame gélosée 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 boîtes 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'entraîner à percer les puits sur des boîtes gélosées ne contenant pas d'anticorps de façon à limiter les risques d'échec sur les boîtes les plus coûteuses.

Il peut être par ailleurs proposé aux élèves de couler eux-mêmes les boîtes, c'est un geste technique simple à effectuer.

FICHE PREPARATEUR

A. Préparation des boîtes :

1. Préparation de la gélose :

Dans le flacon de 175 ml d'eau :

- Ajouter les 3g d'agar fournis
- Fermer sans visser (pour limiter l'évaporation lors du chauffage)
- Porter à ébullition quelques secondes pour dissoudre l'agar.
- Si l'évaporation est trop importante, réajuster le volume avec de l'eau déminéralisée.
- Laisser refroidir.
- Ajouter le tube d'eau basique, bien mélanger
- Couler les 30 boîtes (Elles peuvent être coulées la veille et conservées au réfrigérateur à 4°C.)

2. Préparation des solutions simulant une solution d'Ag

La solution à 14.4 g/l est fournie (solution mère) faire une dilution au $\frac{1}{2}$; une au $\frac{1}{4}$ et une au $\frac{1}{5}$ dans de l'eau déminéralisée (utiliser les 3 μ tubes fournis pour les stocker) vous obtiendrez 4 solutions à :

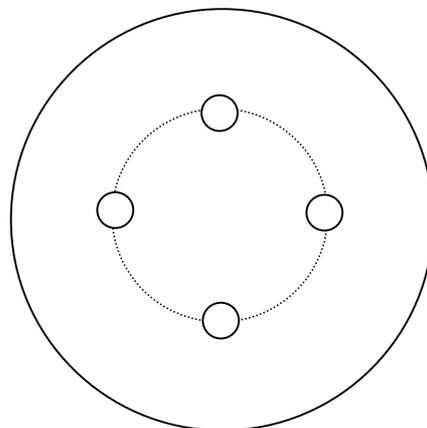
14.4 g/l ; 7.2g/l ; 4.8 g/l et 3.6 g/l

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.

Page 4/4

C. Réalisation des puits dans la boîte de gélose :

Poser la boîte 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 attiré.

E. Obtention des résultats :

Placer les boîtes à température ambiante pendant 24H, dans une enceinte humidificatrice (papier absorbant humide dans une enceinte fermée).

Une fois les résultats obtenus, si l'on veut conserver les boîtes on peut les installer dans une enceinte humidificatrice (papier absorbant humide dans une enceinte fermée) au réfrigérateur.

F. Lecture des résultats :

Au bout de 24 heures, un disque apparaît autour des puits. Il faut en mesurer le diamètre.

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 $ZnSO_4$.

RESULTATS ET INTERPRETATION

A l'aide d'un tableur, l'élève doit tracer la courbe des carrés des diamètres mesurés en fonction de la concentration de $ZnSO_4$.

Puis il doit ajouter une courbe de tendance linéaire

Il peut alors retrouver la concentration inconnue.