

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR FACULTE DE MEDECINE- ANNABA
Service de Parasitologie - Mycologie Médicales
Enseignement destiné aux étudiants de 4^{ème} Année Pharmacie
Professeur R. MANSOURI

LES RÉACTIONS IMMUNOENZYMATIQUES ET LEURS APPLICATIONS EN PARASITLOGIE-MYCOLOGIE MEDICALES

Pr MANSOURI R.

Introduction

■ Le diagnostic de certitude des parasitoses repose sur la mise en évidence de l'agent causal dans les prélèvements biologiques.

■ Néanmoins, les tests immunologiques sont très utiles et parfois indispensables pour le diagnostic, le suivi thérapeutique, et les enquêtes épidémiologiques.

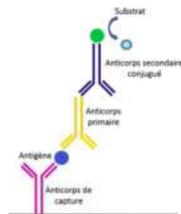
■ Plusieurs techniques sont disponibles, et il est souvent nécessaire de les associer.

- **Historique :**

- A la fin des années 60, des chercheurs mettent au point une technique d'analyse d'immunoenzymologie
- La technique d'ELISA a été développée par deux scientifiques, Perlmann P. et Engvall E. en 1971.

Objectifs des techniques séro-immunologiques:

- ❖ Mettre en évidence des anticorps (Ac) – Présent dans le sang/sérum/plasma ou d'autres liquides biologiques (LCR,...)
- ❖ Mettre en évidence des antigènes (Ag) présents dans les liquides biologiques (sérum, LCR, urines...) à l'aide d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux



Indications du diagnostic sérologique

Les Réactions immunologiques sont indiqués :

■ Lorsque le diagnostic de certitude est impossible ou difficile:

- ❖ Localisation tissulaire
- ❖ Phase de migration larvaire tissulaire de certains helminthes
- ❖ Faible parasitisme

■ pour préciser :

- ❖ Le stade de la parasitose
- ❖ La classes d'Ig (IgA,IgM,IgG) : infection récente, évolutive, ou ancienne (Toxoplasmose).
- ❖ Mesure de l'avidité

Prérequis

Le diagnostic de laboratoire des parasitoses et
mycoses concernées - section diagnostic SERO-
IMMUNOLOGIQUE

DÉJÀ Étudié pendant le 1^{er} semestre
«conférences et photocopies »

LES TECHNIQUES IMMUNOENZYMATIQUES

Pr MANSOURI R.

I. ELISA

(*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)



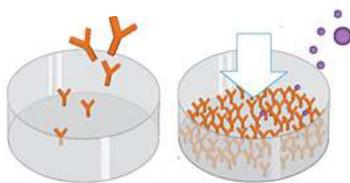
Pr MANSOURI R.

PRINCIPE GÉNÉRAL

- La technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée «ELISA» est principalement utilisée pour détecter et/ou doser la présence d'anticorps ou d'antigènes, dans un prélèvement.
- La fixation spécifique de l'Ac ou l'Ag à doser a lieu sur un support solide, de sorte que ce dernier puisse être identifié par un Ac ou Ag spécifique marqué par une enzyme.
- La présence d'enzyme, en cas de réaction positive, est ensuite révélée par l'ajout d'un substrat chromogène qui prend une coloration proportionnelle à la quantité d'Ac ou d'Ag à doser, mesurable par un spectrophotomètre.

ELISA

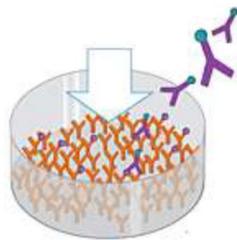
FIXATION
(support solide)



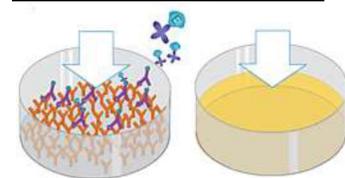
IDENTIFICATION
(Ac* par une enzyme)

ENZYMES UTILISES

- Peroxydase
- Phosphatase alcaline

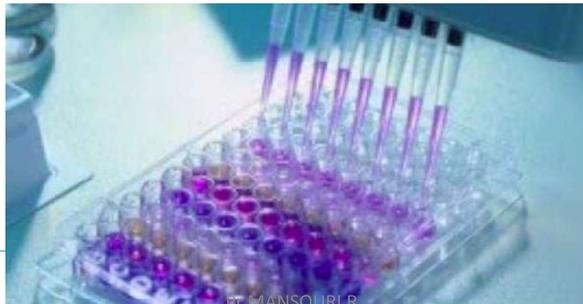


REVELATION
(Chromogène)



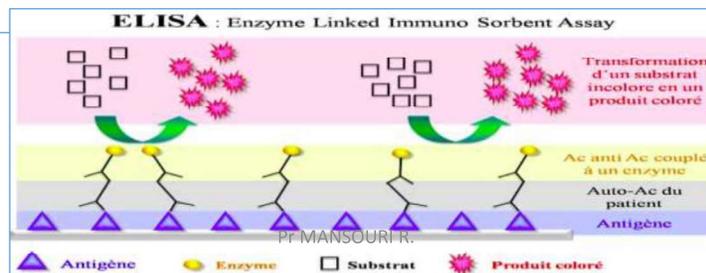
LES MÉTHODES ELISA

- Plusieurs modalités de dosage sont possibles
 - ✓ ELISA indirect
 - ✓ ELISA Sandwich
 - ✓ ELISA par compétition
- Ces techniques permettent le dosage des Ag et des Ac.
- Toutes les manipulations doivent s'accompagner
 - **de témoins positifs et témoins négatifs**

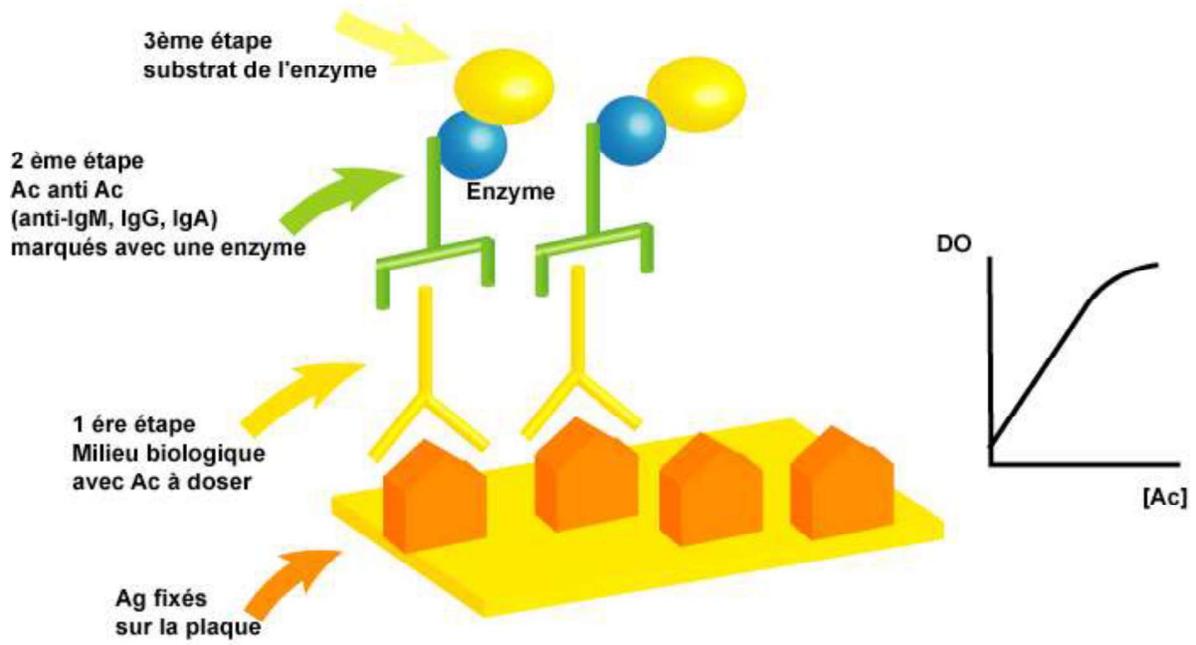


1. Recherche et Dosage d'Ac par ELISA Indirect

- ❖ Utilisation de support solide : microplaques sensibilisées avec l'antigène "**coating**"
- ❖ Dépôt du sérum du patient et incubation les Ac réagissent avec l'Ag fixé sur le support solide.
- Incubation puis Lavages pour évacuer les Ac non liés.
- ❖: Ajout des Ac anti-immunoglobulines humaines conjugué à une enzyme pour mesurer la quantité d'Ac fixé sur l'Ag
- Incubation puis Lavages pour évacuer les Ac secondaires non liés.
- ❖ Ajout du substrat chromogène incolore qui permet de donner une coloration proportionnelle à la quantité d'Ac à doser.
- Mesure spectrophotométrique de la réaction colorée



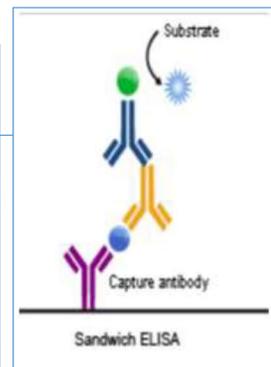
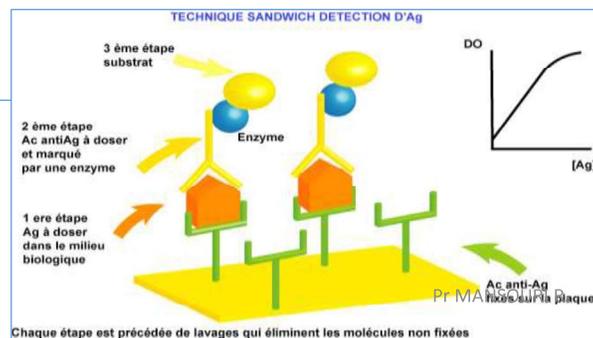
ELISA INDIRECT DETECTION D'Ac



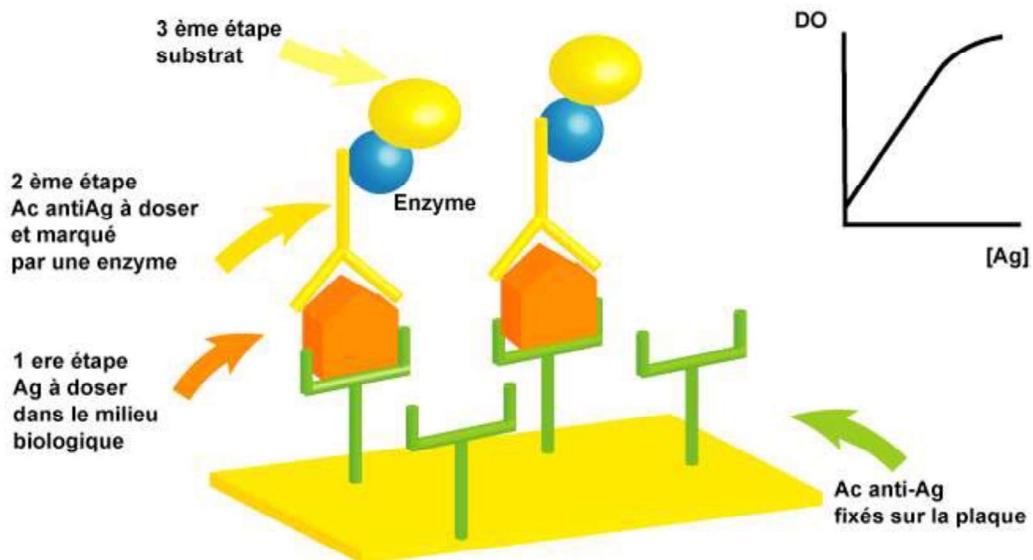
Chaque étape est précédée de lavages qui éliminent les molécules non fixées

2. Recherche et Dosage d'Ag par ELISA de type sandwich

- ❖ l'Ag à doser réagit avec des Ac spécifiques préalablement fixé sur un support solide.
- ❖ l'Ag ainsi fixé est identifié par un autre Ac couplé à une enzyme.
- ❖ l'ajout du substrat chromogène permet de donner une coloration proportionnelle à la quantité d'Ag à doser.
- ❖ Réaliser les lavages entre chaque étape pour évacuer les molécules non fixées



TECHNIQUE SANDWICH DETECTION D'Ag

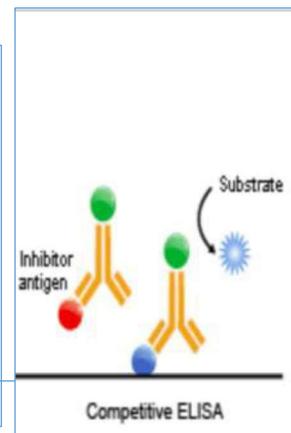
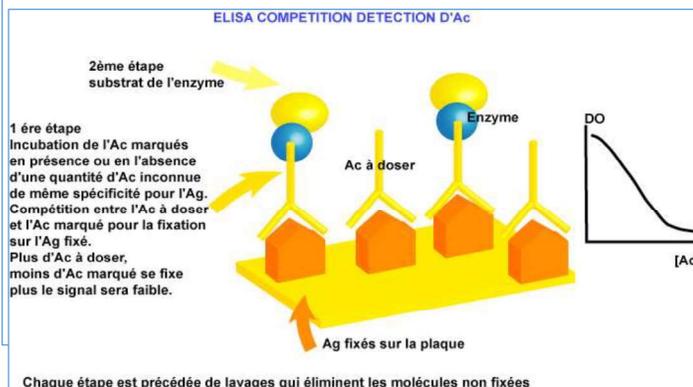


Chaque étape est précédée de lavages qui éliminent les molécules non fixées

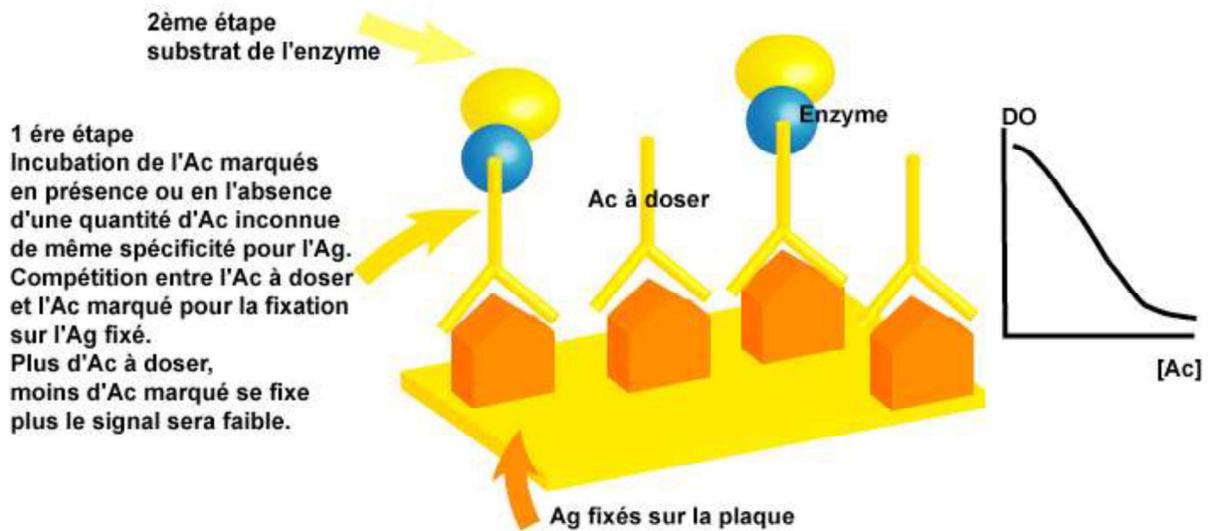
Le dosage de type sandwich est le procédé qui donne les résultats les plus satisfaisants, aussi bien du point de vue de la sensibilité que de la reproductibilité.

3. Dosages d'Ac par compétition avec un Ac marqué

- ❖ L'Ac à doser est mélangé avec des quantités déterminées d'Ac marqué à l'enzyme, dans des conditions telles qu'il y ait compétition entre l'Ac à doser et l'Ac marqué pour un nombre limité de sites d'Ag immobilisés sur la phase solide.
- ❖ Ajout du substrat chromogène permet de donner une coloration **inversement proportionnelle** à la quantité d'Ag à doser.



ELISA COMPETITION DETECTION D'Ac



Chaque étape est précédée de lavages qui éliminent les molécules non fixées

AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE L'ELISA

AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
- Simple, sensible et spécifique avec une bonne reproductibilité.	- La nature de l'Ag conditionne complètement la qualité de la réaction
- Applicable à plusieurs types de prélèvements	- Matériel spécifique (spectrophotomètre)
- Rapide : résultat en 2 à 3 heures	- Inconstance de fixation de l'antigène.
- Automatisable avec lecture objective	- Nécessité d'un personnel qualifié
- Economique : faible quantité de sérum	
- Se prête aux grandes séries	
- Permet la recherche de la classe d'Ac	

Application de la technique ELISA en Parasitologie-Mycologie

PROTOZOOSSES

- ❖ Sérodiagnostic de la toxoplasmose
- ❖ Sérodiagnostic de la leishmaniose viscérale
- ❖ Sérodiagnostic de l'amébose extra-intestinale

Autres protozooses

- ❖ Paludisme
- ❖ Trypanosomoses
- ❖ Cryptosporidiose

Application de la technique ELISA en Parasitologie-Mycologie

HELMINTHOSES

- ❖ Sérodiagnostic de l'hydatidose
- ❖ Sérodiagnostic de la toxocarose
- ❖ Sérodiagnostic de la Trichinellose
- ❖ Sérodiagnostic de la bilharzioses

Autres helminthoses

- ❖ Ascariidose
- ❖ Distomatoses

Application de la technique ELISA en Parasitologie-Mycologie

MYCOSES

❖ **Sérodiagnostic des candidoses**

❖ **Sérodiagnostic des aspergilloses**

Autres mycoses

❖ **Mycoses profondes**

Exemple de l'application de la technique ELISA en Parasitologie

Toxoplasmose

Pour

- la cinétique des Ac au cours de la toxoplasmose acquise

et pour

- les interprétations des sérologies toxoplasmiques revoir la conférence et le polycopié du 1^{er} semestre

Exemple de l'application de la technique ELISA en Parasitologie

Toxoplasmose

■ Source d'antigène :

L'Ag utilisé est un Ag mixte membranaire et cytoplasmique. Il est obtenu à partir d'une suspension de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* de la souche RH de Sabin inoculée à des souris blanches de laboratoire.

■ Seuils de spécificité :

Selon les KITS les seuils de spécificité varient entre 2-6 UI/ml.

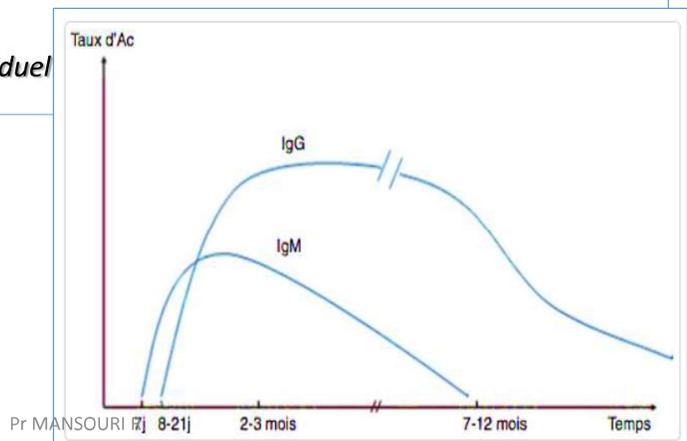
**Rappel concis de la Cinétique des anticorps
IgM et IgG au cours d'une primo-infection toxoplasmique**

Les IgM

- apparaissent fin de la 1^e semaine // détectées 7 à 12 mois
- *la présence d'Ac de classe IgM seule ne permet pas d'affirmer une toxoplasmose évolutive*

Les IgG

- apparaissent à partir du 8^e jour
- s'élèvent pour atteindre un plateau en 2^e ou 3^e mois
- puis diminuent
- *persistent toute la vie à un taux résiduel*



**Rappel concis de la Cinétique des anticorps
IgM et IgG au cours d'une primo-infection toxoplasmique**

Nécessité d'étudier 2 sérums espacés de 15 j pour mettre en évidence

- soit une séroconversion : 1^{er}sérum nég. , 2^esérum pos.
- soit la présence d'IgM associée à une augmentation du titre des IgG entre 1^{er}sérum et le 2^esérum titrés en parallèle.

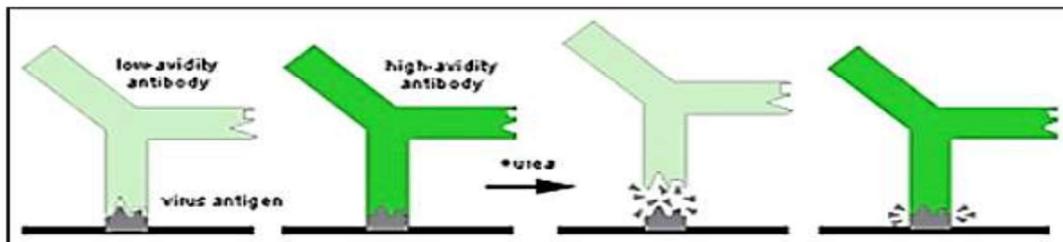
Associer la détermination du **coefficient d'avidité « TEST D'AVIDITE »**
ou la recherche des IgA spécifiques pour faire la distinction entre une infection
récente ou ancienne

Test d'avidité

❖ **DÉFINITION** : c'est une réaction immunoenzymatique qui permet de mesurer l'avidité des anticorps IgG anti-toxoplasmique de la femme enceinte.

❖ **INDICATION** : La détection de l'avidité des IgG Toxoplasmique permet de dater les séroconversion de la femme enceinte.

- Cette avidité désigne la force avec laquelle l'anticorps se lie avec l'antigène spécifique.
- Au cours de la toxoplasmose aiguë, les IgG sont peu avides. Et cette avidité va croître avec le temps pour aboutir à une avidité maximale au cours de la toxoplasmose chronique.



Pr MANSOURI R.

❖ LES ÉTAPES DU TEST D'AVIDITÉ :

- Les puits de la plaque de microtitration sont sensibilisés avec l'Ag de *T. gondii*
- Les sérum à étudier sont dilués ainsi que les témoins et sont distribués en double dans la plaque de microtitration (deux séries)
- Incubation 30 min à 37°C
 - Lavage : une série des puits est lavé avec la solution de lavage standard et l'autre série avec l'urée.
 - Distribution du conjugué enzymatique.
 - Incubation à 37°C pendant 30 min.
 - Révélation : on ajoute le chromogène et on incube 30 min à la température de laboratoire à l'abri de la lumière.
 - On ajoute la solution d'arrêt pour arrêter la réaction enzymatique.
 - L'absorbance est déterminé par une lecture au spectrophotomètre.

❖ **L'INDICE D'AVIDITÉ** : c'est le rapport entre l'absorbance de sérum qui est lavé par la solution d'urée et l'absorbance du sérum lavé par la solution de la lavage standard

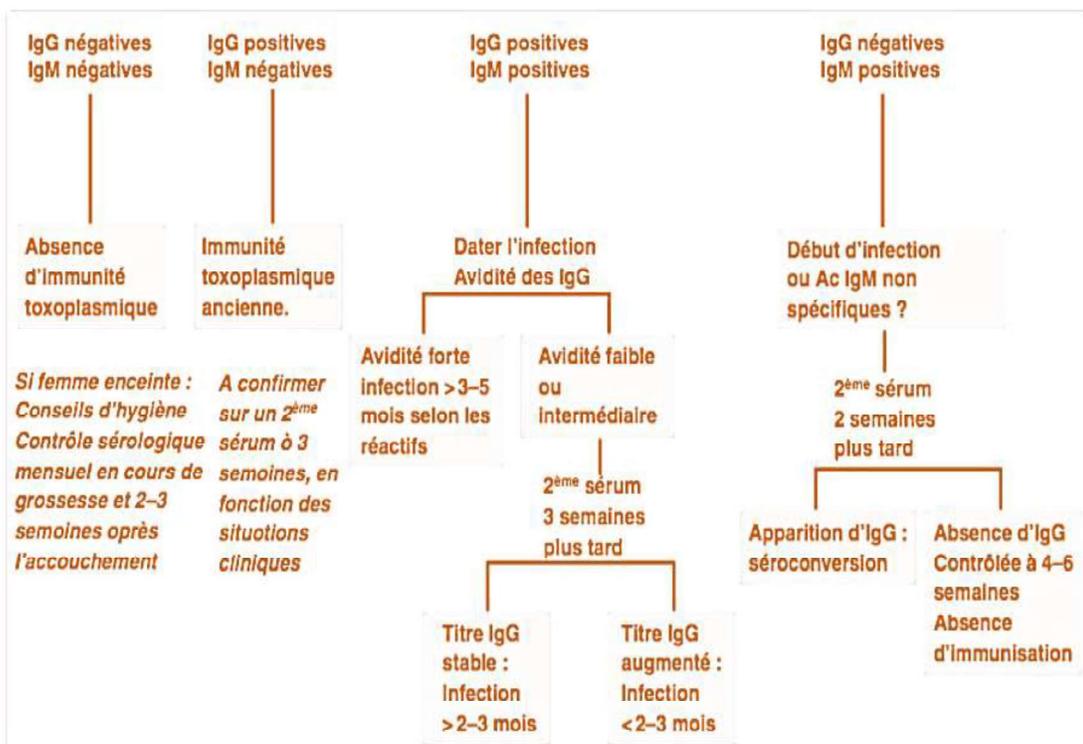
$$\text{Indice d'avidité (iA)} = \frac{DO \text{ urée}}{DO \text{ standard}}$$

❖ **INTERPRÉTATION :**

- Si $iA \geq 0,6 \Rightarrow$ toxoplasmose ancienne de plus d'une année



Interprétations des sérologies toxoplasmiques



Suivi sérologique Toxoplasmose congénitale

Si séroconversion toxoplasmique chez la femme enceinte

❖ Diagnostic anténatal :

« Amniocentèse pour PCR + inoculation à la souris +

surveillance échographie + Spiramycine »

- Si + : interruption thérapeutique de grossesse // Trt
- Si - : Spiramycine jusqu'à l'accouchement

❖ Diagnostic néonatal:

« inoculation du placenta à la souris + Profil immunologique comparé mère – enfant Western Blot* /ELIFA* + sérologie IgM IgG + signes cliniques

- ❖ Si + : Trt + surveillance/ fond d'œil
- ❖ Si - : surveillance sérologique IgM IgG, jusqu'à l'âge de 1 an

***Voir techniques: Western Blot ELIFA**

PI MANSOURI R.